

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS  
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS**

**ESTUDO DO BALANÇO DE MASSA E DO PERFIL DE  
ISOFLAVONAS NO PROCESSAMENTO DE ISOLADO E  
CONCENTRADOS PROTÉICOS DE SOJA**

**MARIA CRISTINA YOUN LUI**  
**Engenheira de Alimentos**

**Orientador: Prof. Dr. YONG K. PARK**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Engenharia de Alimentos da Universidade  
Estadual de Campinas, para obtenção do  
Título de Mestre em Ciência de Alimentos

**Campinas**  
**São Paulo – Brasil**  
**2004**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA DA F.E.A. – UNICA

L968e      Lui, Maria Cristina Youn  
Estudo do balanço de massa e do perfil de isoflavonas no  
processamento de isolado e concentrados protéicos de soja /  
Maria Cristina Youn Lui. – Campinas, SP: [s.n.], 2004.

Orientador: Yong Kun Park  
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de  
Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1.Isoflavonas. 2.Isolado protéico de soja. 3.Concentrado  
protéico de soja. 4.Balanço de massa. Processamento. I. Park,  
Yong Kun. II.Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de  
Engenharia de Alimentos. III.Título.

cars-fea

## **BANCA EXAMINADORA**

Dissertação defendida e aprovada em ..... de ..... de ....., sendo a banca examinadora composta por:

---

Prof. Dr. Yong Kun Park  
Orientador

---

Profa. Dra. Helena Teixeira Godoy  
Membro

---

Prof. Dr. Severino Matias de Alencar  
Membro

---

Prof. Dra. Fernanda Paula Collares  
Membro



Dedico este trabalho

À família Lui, em suas 3 gerações:

À valente e trabalhadora Dona Lui Ng Yue Po, minha mãe;

Ao meu falecido pai, o sr. Luis Hau Youn;

À minha querida Tia Zélia,

Aos meus irmãos: Maria, Antonio, Rosa, Paulo (*in memorian*), Roberto, Tereza e Lúcia.

Às minhas sobrinhas e amigas Angela e Ana, e aos meus sobrinhos Pedro e Laura, alegrias da minha vida.

E especialmente, ao meu querido marido Rodrigo, companheiro e amigo de todas as horas.



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que, de uma forma ou de outra, contribuíram para a realização deste trabalho.

A Deus por olhar por mim durante toda vida e iluminar meu caminho nos momentos mais difíceis.

À minha família: a minha mãe, que trabalhou muito para que meus irmãos e eu pudéssemos estudar; a Rosa e ao Antonio, que foram mais que irmãos para mim: foram meus guias, meus exemplos, meus conselheiros; às minhas irmãs Tereza e Lúcia, que me incentivaram em todos os momentos.

Ao meu marido Rodrigo pelo apoio, incentivo e compreensão pelas longas horas ausentes trabalhando nesta dissertação, por me levar almoço quando não tinha tempo de sair do laboratório; por me buscar de madrugada quando ficava trabalhando até tarde, por me consolar quando estava desanimada, enfim, por todos os gestos de carinho e amor que tornaram esta jornada mais suave.

Ao Prof. Dr. Yong Kun Park, pela orientação, por me aceitar como aluna com dedicação em regime de tempo parcial e sobretudo, por repartir comigo um pouco de seu vasto conhecimento científico.

Aos Profs. Dra. Helena T. Godoy, Dra. Fernanda P. Collares e Dr. Severino M. de Alencar pela atenta correção desta dissertação.

À Sadia S. A., na pessoa do sr. Getulio Takahashi, pelo apoio e pela possibilidade de dedicar tempo ao mestrado.

Às Profa. Dra. Adilma R. P. Scamparini e Profa. Dra. Adriana Mercadante pela permissão do uso de cromatógrafo utilizado neste trabalho.

Aos funcionários do Laboratório de Bioquímica da FEA Beatriz Mello, Eliane Pereira, Guilherme Jacyntho, Marcelo Funo, Maria das Dores e em especial, às funcionárias Karla Nery, do Laboratório Geral de Alimentos da FEA e Cristina Ferreira Boccato, do Laboratório de Análise de Alimentos da FEA, pela ajuda e dicas no trabalho laboratorial.

Aos colegas de laboratório Cláudio Aguiar, Julio Paredes, Gabriela “Biba”, Hermelinda, Luciana Bittar, Luciana Ferracini, Luciana Fleuri, Luciana Liboni, Margarida e Neiva pelo companheirismo, conselhos e apoio moral.

Aos amigos do coração e companheiros de laboratório Alice Fujita, Haroldo Kawaguti e Severino Matias de Alencar pelo apoio, amizade e palavras de encorajamento. Sem o incentivo e ajuda de vocês eu não teria chegado ao final deste trabalho.



## ÍNDICE

LISTA DE FIGURAS.....	xiii
LISTA DE TABELAS.....	xv
LISTA DE QUADROS.....	xvii
ABREVIACÕES.....	xix
RESUMO.....	xxi
SUMMARY.....	xxiii
1. Introdução.....	1
2. Objetivos do estudo.....	5
3. Revisão Bibliográfica.....	7
3.1. Isoflavonas de soja .....	7
3.1.1. Estrutura química e ocorrência em grãos de soja.....	7
3.1.2. Alterações de isoflavonas durante o processamento de alimentos .....	12
3.1.3. Extração e quantificação de isoflavonas de alimentos de soja .....	16
3.1.4. Absorção e metabolismo de isoflavonas.....	17
3.1.5. Biodisponibilidade de isoflavonas .....	26
3.1.6. Atividades biológicas das isoflavonas de soja .....	32
3.1.6.1. Atividade estrogênica e antiestrogênica .....	33
3.1.6.1.1. Isoflavonas e a síndrome do climatério (sintomas de menopausa) .....	39
3.1.6.1.2. Isoflavonas e osteoporose.....	40
3.1.6.2. Atividade anticarcinogênica .....	46
3.1.6.3. Atividade hipocolesterolêmica .....	52
3.1.7. Ingestão diária recomendada de isoflavonas.....	58
3.2. Isolado protéico de soja (IPS) .....	60
3.2.1 Definição, histórico e utilização .....	60
3.2.2. Processo de produção de IPS .....	61
3.2.3. Rendimento e qualidade do IPS.....	65
3.2.4. Resíduos de processo e sua utilização .....	65

3.2.5. Processos não-convencionais de produção de IPS.....	66
3.3. Concentrado protéico de soja (CPS) .....	67
3.3.1. Definição, histórico e utilização .....	67
3.3.2. Processos de produção de CPS .....	69
3.3.2.1. Precipitação com solução alcoólica.....	71
3.3.2.2. Precipitação com solução ácida.....	74
3.3.2.3. Desnaturação por vapor/lavagem com água.....	74
3.3.3. Rendimentos do processo .....	75
4. Materiais e métodos.....	77
4.1. Materiais .....	77
4.1.1. Matéria-prima .....	77
4.1.2. Reagentes .....	77
4.2. Métodos.....	77
4.2.1. Obtenção de IPS em escala laboratorial .....	77
4.2.2. Obtenção de CPS em escala laboratorial por precipitação com ácido.....	81
4.2.3. Obtenção de CPSs em escala laboratorial por precipitação alcoólica .....	83
4.2.4 - Extração de isoflavonas .....	83
4.2.5 - Determinação de isoflavonas por CLAE.....	83
4.2.6 Determinação de proteínas.....	84
4.2.7 Determinação de umidade e sólidos totais.....	85
4.2.8. Análise estatística .....	85
5. Resultados e discussão	87
5.1. Processamento de IPS em escala laboratorial .....	87
5.2. CPS obtidos em escala laboratorial : comparação entre precipitação ácida a pH 4,5 e com etanol 60% (v/v) .....	101
5.3. Comparação entre processamentos em escala laboratorial de CPSs com etanol 40, 50, 60, 70 e 80% (v/v) .....	111
5.3.1. Rendimento em peso e em proteína.....	111
5.3.2. Retenção e perfil de isoflavonas nos CPS dos processamentos com etanol 40, 50, 60, 70 e 80% (v/v).....	114
5.4. Considerações gerais sobre os processamentos avaliados .....	122

6. Conclusões gerais.....	125
7. Sugestões para futuros trabalhos .....	127
8. Referências bibliográficas.....	129



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química de isoflavona.....	7
Figura 2: Estruturas químicas das isoflavonas agliconas da soja.....	9
Figura 3: Isoflavonas glicosiladas de soja.....	9
Figura 4: Rotas metabólicas para daidzeína.....	19
Figura 5: Metabolismo da genisteína.....	21
Figura 6: Principais biotransformações do metabolismo de isoflavonas em humanos e animais.....	23
Figura 7: Similaridade entre estruturas químicas do estrógeno fisiológico 17- $\beta$ -estradiol e a isoflavona genisteína.....	33
Figura 8: Distribuição anatômica dos receptores de estrogênio ER $\alpha$ e ER $\beta$ .....	37
Figura 9: Estrutura química do raloxifeno.....	43
Figura 10: Estrutura química da ipriflavona.....	43
Figura 11: Fluxograma de produção de IPSs em escala industrial.....	63
Figura 12: Fluxograma de produção de CPSs em escala industrial.....	71
Figura 13: Fluxograma de produção de IPS em escala laboratorial.....	79
Figura 14: Fluxograma de produção de CPSs em escala laboratorial.....	81
Figura 15: Percentual de retenção das proteínas presentes na FSD nas correntes do processamento de IPS em escala laboratorial.....	89
Figura 16: Percentual de retenção de isoflavonas totais nas correntes de processamento de IPS em escala laboratorial.....	91

Figura 17: Distribuição percentual das formas de isoflavonas em correntes de processamento IPS em escala laboratorial (em base seca).....	95
Figura 18: Perfis cromatográficos de isoflavonas nas correntes de processamento de IPS em escala laboratorial.....	97
Figura 19: Percentual de retenção de isoflavonas em correntes de processamento de CPSs em escala laboratorial: comparação entre precipitação ácida a pH 4,5 e com etanol 60% (v/v).....	103
Figura 20: Perfis cromatográficos de isoflavonas nas correntes de processamentos de CPSs em escala laboratorial: comparação entre precipitação ácida a pH 4,5 e com etanol 60% (v/v).....	107
Figura 21: Distribuição percentual das formas de isoflavonas em correntes de processamento de CPSs em escala laboratorial: comparação entre precipitação com solução ácida a pH 4,5 e com etanol 60% (v/v).....	111
Figura 22: Percentual de retenção de isoflavonas em CPSs obtidos em escala laboratorial por precipitação com etanol 40, 50, 60, 70 e 80% (v/v).....	115
Figura 23: Perfil de distribuição percentual de isoflavonas nos CPSs obtidos em escala laboratorial por precipitação com etanol 40, 50, 60, 70 e 80% (v/v).....	117
Figura 24: Perfil de distribuição percentual de isoflavonas nos sobrenadantes de processamento em escala laboratorial de CPSs com etanol 40, 50, 60, 70 e 80% (v/v).....	119

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Afinidade relativa de alguns fitoestrógenos pelos receptores ER $\alpha$ e ER $\beta$ .....	35
Tabela 2: Inibição do crescimento de células cancerosas <i>in vitro</i> pela genisteína.....	50
Tabela 3: Concentração estimada de isoflavonas (expressas como agliconas) em porções de alimentos de soja (mg/porção).....	59
Tabela 4: Padrão brasileiro de identidade e qualidade para IPS.....	61
Tabela 5: Padrão brasileiro de identidade e qualidade para CPS.....	69
Tabela 6: Balanço de massa global para processamento de IPS em escala laboratorial e teores de proteína e isoflavonas nas correntes de processo (matéria-prima, produto final e efluentes).....	87
Tabela 7: Concentração de isoflavonas nas correntes de processamento de IPS em escala laboratorial ( $\mu\text{g/g}$ b.s.).....	94
Tabela 8: Comparação do perfil percentual de isoflavonas da FSD e IPS deste estudo e de produtos comerciais brasileiros.....	100
Tabela 9: Perfil de distribuição de isoflavonas para CPSs obtidos em escala laboratorial: comparação entre precipitação ácida a pH 4,5 e com etanol 60% (v/v).....	106
Tabela 10: Comparação entre rendimento e percentual de proteína dos processamentos em escala laboratorial de CPSs com etanol 40, 50, 60, 70 e 80% (v/v).....	113
Tabela 11: Porcentagem de retenção de proteína nas correntes de processamento em escala laboratorial de CPSs: precipitação com etanol 40, 50, 60, 70 e 80% (v/v).....	114
Tabela 12: Concentração de isoflavonas ( $\mu\text{g/g}$ b.s.) em CPSs obtidos em escala laboratorial por precipitação com etanol 40, 50, 60, 70 e 80% (v/v).....	117

Tabela 13: Concentração de isoflavonas ( $\mu\text{g/mL}$ de sobrenadante filtrado) em sobrenadantes do processamento em escala laboratorial de CPSs com etanol 40, 50, 60, 70 e 80% .....	121
--	-----



## LISTA DE QUADROS

Quadro 1: Concentração de isoflavonas totais ( $\mu\text{g/g}$ b.u.) em soja e alimentos derivados.	14
Quadro 2: Resumo de estudos sobre farmacocinética e metabolismo de isoflavonas de soja.....	27
Quadro 3: Efeitos da soja e seus produtos em estudos sobre câncer induzido em animais.....	48
Quadro 4: Efeitos do consumo de produtos de soja e isoflavonas sobre os lipídios do sangue .....	55
Quadro 5: Propriedades funcionais tecnológicas de IPS e CPS em alimentos.....	68
Quadro 6: Balanço de massa para proteínas em processamento de CPS em escala laboratorial: comparação entre precipitação ácida a pH 4,5 e com etanol 60% (v/v).....	101
Quadro 7: Balanço de massa de isoflavonas para processamento de CPSs em escala laboratorial: comparação entre precipitação ácida a pH 4,5 e com etanol 60% (v/v).....	105



## ABREVIACÕES

<b>AAFCO</b>	Association of American Feed Control Officials, Inc.
<b>b.s.</b>	Base seca
<b>b.u.</b>	Base úmida
<b>CLAE</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência
<b>CNNPA</b>	Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos
<b>CPS</b>	Concentrado protéico de soja
<b>CPSs</b>	Concentrados protéicos de soja
<b>d. b.</b>	Dry basis
<b>DNA</b>	cido desoxirribonucléico
<b>DOU</b>	Diário Oficial da União
<b>DSF</b>	Defatted soy flour
<b>EMBRAPA</b>	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuria
<b>FAO</b>	Food and Agriculture Organization of the United Nations
<b>FDA</b>	Food and Drug Administration (EUA)
<b>ER</b>	Receptor de estrognio subtipo 
<b>ER</b>	Receptor de estrognio subtipo 
<b>FSD</b>	Farinha de soja desengordurada
<b>FSDs</b>	Farinhas de soja desengordurada
<b>HDL</b>	Lipoprotenas de alta densidade
<b>HPLC</b>	High pressure liquid chromatography
<b>IPS</b>	Isolado protéico de soja
<b>IPSs</b>	Isolados protéicos de soja

<b>IDP</b>	Índice de proteína dispersível
<b>LDL</b>	Lipoproteínas de baixa densidade
<b>NCI</b>	National Cancer Institute (EUA)
<b>NHI</b>	National Health Institute (EUA)
<b>p/p</b>	Peso por peso
<b>SERMs</b>	Selective estrogen receptor modulators
<b>SHBG</b>	Sex hormon binding globulin
<b>SPC</b>	Soy protein concentrate
<b>SPI</b>	Soy protein isolate
<b>TRH</b>	Terapia de reposição hormonal
<b>VLDL</b>	Lipoproteína de densidade muito baixa
<b>v/v</b>	Volume por volume
<b>WHO</b>	World Health Organization

## RESUMO

As isoflavonas de soja apresentam propriedades biológicas, tais como atividades estrogênica, antioxidante, anticarcinogênica e hipocolesterolêmica. Estas propriedades tornam a produção de alimentos funcionais à base de soja bastante atrativa. Os grãos de soja podem conter até doze tipos de isoflavonas, que podem sofrer transformações durante a produção de alimentos à base de soja, havendo conversão parcial ou total das formas esterificadas para as formas glicosiladas e agliconas, dependendo das condições de processamento. Há evidências de que as isoflavonas agliconas são absorvidas mais rapidamente pelo intestino delgado do que as formas glicosiladas, logo, é importante avaliar não somente o total de isoflavonas contido nos alimentos de soja, mas também o perfil de distribuição das formas presentes (malonil conjugados, acetil conjugados,  $\beta$ -glicosídeos e agliconas). O presente trabalho teve como objetivo realizar estudos de balanços de massa e do perfil de isoflavonas no processamento de dois ingredientes industriais à base de soja: isolado e concentrado protéico. O isolado protéico de soja (IPS) foi obtido a partir de farinha de soja desengordurada (FSD) por solubilização das proteínas em solução alcalina (pH 9,0) a 55°C, seguida de centrifugação para retirada do material insolúvel. As proteínas foram precipitadas por acidificação do sobrenadante a pH 4,5. Os concentrados protéicos de soja (CPSs) foram obtidos a partir da FSD por precipitação das proteínas com solução ácida (pH 4,5) ou com solução alcoólica, cujas concentrações de etanol variaram de 40% a 80% (v/v). As isoflavonas foram analisadas por CLAE. A concentração de isoflavonas na matéria-prima dos processos, a FSD, foi de 1.500  $\mu\text{g/g}$  b.s., com 56,7% na forma de malonil conjugados e apenas 4,4% na forma de agliconas. O IPS obtido apresentou uma concentração de 690  $\mu\text{g/g}$  b.s. de isoflavonas, correspondendo a uma retenção de 18,1% do total de isoflavonas presentes na matéria-prima. O perfil de isoflavonas do IPS indica que o processamento promoveu hidrólise: 20,3% das isoflavonas do IPS estavam sob a forma de agliconas e 37,6% na forma de malonil glicosídeos. O processamento de CPS por precipitação ácida gerou o produto com maior concentração de isoflavonas: 871  $\mu\text{g/g}$  b.s., havendo uma retenção de 41,7% do total de isoflavonas presentes na FSD. Houve diminuição do percentual de malonil glicosídeos (de 56,7% para 44,0%) e  $\beta$ -glicosídeos (de 34,9% para 10,4%), e grande aumento do percentual de agliconas (de 4,4% para 37,6%)

em comparação à FSD. Os produtos obtidos nos processos alcoólicos retiveram pouca quantidade de isoflavonas, cujas concentrações variaram entre 133,0 a 172,9 µg/g b.s. O aumento da concentração de álcool no meio diminuiu a retenção de isoflavonas nos produtos finais, mas pouco alterou o perfil de distribuição destas nos CPSs em comparação com a FSD. As maiores perdas de isoflavonas em todos os processos foram verificadas nos sobrenadantes: acima de 90% para os processos com álcool, 52% para o processo de IPS e 47% para a precipitação ácida de CPS.

Palavras-chave: isoflavonas, isolado protéico de soja, concentrado protéico de soja, balanço de massa, processamento.

## SUMMARY

Soy isoflavones have shown biological properties, such as estrogenic, antioxidant, anticancer and hypocholesterolemic activities, fact that draws attention to the formulation of soy based functional foods. Soybeans may contain up to twelve different forms of isoflavones, which may undergo transformations during the production of soy foods: the esterified forms may be partially or totally converted to  $\beta$ -glucosides or aglycones, depending on the processes conditions. There are evidences that the aglycones are more rapidly absorbed in the human small intestine than the  $\beta$ -glucosides. Therefore, it is important to evaluate not only the total amount of isoflavones contained in soy foods, but also the profile of isoflavone distribution into malonyl conjugates, acetyl conjugates,  $\beta$ -glucosides or aglycones. The aim of this work was to study the isoflavones mass balance and profiles during the processing of two soy industrial ingredients: soy protein isolate (SPI) and soy protein concentrate (SPC). The SPI was obtained from defatted soy flour (DSF) by alkaline extraction (pH 9,0) at 55 °C, followed by centrifugation to remove the insoluble residue. The proteins were precipitated by acidification of the supernatant to pH 4,5. The SPCs were obtained either by precipitation with acid solution at pH 4,5 or by alcoholic solutions, with ethanol concentrations ranging from 40% to 80 % (v/v). The isoflavones were analyzed by reverse HPLC. The isoflavone concentration on the processes raw material, the DSF, was 1.500  $\mu\text{g/g}$  d. b. (dry basis), with 56,7% in the malonyl conjugate forms and only 4,4% in the aglycone forms. The obtained SPI had an isoflavone concentration of 690  $\mu\text{g/g}$  d. b., which corresponded to a 18,1% retention of the total amount of isoflavones contained in the DSF. The SPI isoflavone profile indicated that the processing promoted hydrolysis: 20,3% of the SPI isoflavones were in the aglycone form, and 37,7% in the malonyl glucoside form. The SPC acid processing yielded the product with the highest isoflavone concentration: 871  $\mu\text{g/g}$  d.b., with a 41,7% retention of the total amount of isoflavones contained in the DSF. There was a decrease in the relative percentage of malonyl glucosides and  $\beta$ -glucosides (from 56,7% to 44,0%, and from 34,9% to 10,4%, respectively), while there was a great increase in the percentage of aglycones (from 4,4% to 37,6), when comparing the SPC to the DSF. The products obtained by ethanolic precipitation retained small amounts of isoflavones, whose concentrations varied

from 133,0 to 172,9  $\mu\text{g g/g d.b.}$  The increase in the alcohol concentration in the solvent media decreased the amount of isoflavones retained in the final products, but practically did not change the isoflavone profile of the SPCs in comparison to the DFS. The majority of the isoflavones were lost in the process supernatants: more than 90% for the ethanolic processes, 52% for the SPI process and 47% for the SPC acid precipitation.

Key-words: isoflavones, soy protein isolate, soy protein concentrate, mass balance, processing.



## 1. INTRODUÇÃO

A soja (*Glycine max* Merrill) é uma planta herbácea originária da China, pertencente à família das leguminosas. Foi introduzida no Brasil em 1882, mas sua produção somente atingiu níveis relevantes a partir de 1949 (Zangelmi et al., 1982), atingindo 50 milhões de toneladas em 2003 (Agnol, 2004). O Brasil é atualmente o segundo maior produtor de soja do mundo e detém 38% do mercado mundial de exportação de soja em grão (Edward, 2004). As exportações de grãos de soja, farelo e óleo responderam por 77% do total de soja produzido no Brasil em 2003, movimentando 8,2 bilhões de dólares, o que corresponde a 12% da receita total do país obtida com exportações (Agnol, 2004). Dessa forma, é inegável a importância econômica da pesquisa sobre soja no país, desde a produção agrícola, passando por seu processamento industrial até a comercialização de seus produtos e subprodutos.

Atualmente, há um grande interesse na pesquisa e produção de alimentos funcionais, pois diversos estudos têm comprovado cada vez mais a relação entre a dieta e a prevenção de males como o câncer e as doenças cardiovasculares (Messina, 1999). A soja e seus produtos apresentam grande potencial nesse mercado devido à presença de isoflavonas, as quais têm sido largamente estudadas quanto aos seus efeitos biológicos benéficos à saúde humana, como: atividade estrogênica (Murphy, 1982); antiestrogênica, especialmente sobre os sintomas da síndrome de climatério e da osteoporose (Molteni et al., 1995; Potter et al., 1998; Dalais et al., 1998); hipocolesterolêmica (Anthony et al., 1997) e anticarcinogênica (Coward et al., 1993; 1998; Kim et al., 1998).

Os grãos de soja podem conter até doze tipos de isoflavonas: as formas agliconas daidzeína, gliciteína e genisteína; os  $\beta$ -glicosídeos conjugados: daidzina, glicitina, genistina; os acetil glicosídeos conjugados: 6''-O-acetil daidzina, 6''-O-acetil glicitina, 6''-O-acetil genistina; e os malonil glicosídeos conjugados: 6''-O-malonil daidzina, 6''-O-malonil glicitina e 6''-O-malonil genistina. A isoflavona de soja que apresenta o maior potencial biológico é a genisteína, capaz de inibir, *in vitro*, a ação de enzimas ligadas à proliferação de tumores, como a tirosina quinase e DNA topoisomerase (Peterson, 1995).

Um fator importante a ser considerado é a absorção e biodisponibilidade das isoflavonas. Estudos com mulheres (Xu et al., 1995) demonstraram que as isoflavonas glicosiladas não são absorvidas diretamente, devido principalmente à glicose em ligação beta. Em 2002, Setchell et al. comprovaram que as isoflavonas glicosiladas sofrem hidrólise prévia a agliconas por ação de  $\beta$ -glicosidases intestinais antes de serem absorvidas pelo organismo humano, indicando que a forma de apresentação das isoflavonas interfere na velocidade de absorção.

O processamento afeta a quantidade e o perfil de distribuição de isoflavonas. O aquecimento em meio aquoso pode promover a conversão de malonil glicosídeos a  $\beta$ -glicosídeos (Wang & Murphy, 1994 a), enquanto que a aplicação de calor seco tende a converter malonil glicosídeos a acetil glicosídeos (Coward et al., 1998). Produtos fermentados de soja apresentam maior teor de isoflavonas agliconas em comparação aos grãos de soja crus, devido à ação da enzima  $\beta$ -glicosidase produzida por microrganismos (György, 1964, citado por Matsuura & Obata, 1993; Ebata et al., 1972, citados por Matsuura et al., 1995; Matsuda et al., 1994). Por outro lado,  $\beta$ -glicosidases vegetais também atuam sobre isoflavonas glicosiladas: Murphy (1982) e Araújo et al. (1997) concluíram que a  $\beta$ -glicosidase da própria soja é responsável pela liberação de daidzeína e genisteína em grãos de soja imersos em água durante o processamento de leite de soja.

Isolado protéico de soja (IPS) é, por definição, “um produto obtido de grãos de soja limpos, descascados e desengordurados, por remoção dos componentes não protéicos, e que deve conter no mínimo 90% de proteína (N x 6,25) em base seca” (Circle & Smith, 1972). As proteínas são extraídas de flocos ou farinha de soja desengordurados com solução alcalina e o extrato clarificado por centrifugação, para remoção do precipitado. A seguir, as globulinas são precipitadas em seu ponto isoelétrico (pH 4,5) por adição de um ácido de grau alimentício. A suspensão é centrifugada e lavada, podendo ou não ser neutralizada antes da secagem em *spray-dryer* (Berk, 1979).

Concentrado protéico de soja (CPS) é “o produto obtido de flocos ou farinha de soja desengordurada, apresentando um mínimo de 70% de proteína (N x 6,25)” (Circle & Smith, 1972). Pode ser obtido por precipitação com solução ácida (pH 4,5), com etanol aquoso 60% - 80% ou com desnaturação por vapor e aquecimento com água quente, sendo os dois primeiros processos mais comumente adotados pela indústria (Berk, 1979).

O IPS e CPS são largamente utilizados na indústria alimentícia, encontrando aplicações em produtos cárneos, de confeitaria, de panificação, bebidas e cereais, entre outros. Seus processos de obtenção foram estabelecidos visando principalmente, o rendimento de extração e a manutenção de propriedades funcionais tecnológicas, como retenção de água, formação de gel, absorção de óleo, emulsificação (Hettiarachchy & Kalapathy, 1999). Dado o potencial biológico das isoflavonas de soja, é interessante conhecer como o processamento desses ingredientes afeta a quantidade e o perfil de isoflavonas, e propor alternativas de processo para minimizar perdas.

Atualmente, não há um consumo generalizado de soja no Brasil, seja na forma de grãos ou produtos tradicionais como tofu, leite de soja, missô ou natto. A aceitabilidade é limitada principalmente, pelo sabor característico dos produtos. O IPS e o CPS apresentam sabor suave em relação aos grãos de soja, pois os compostos responsáveis pelo sabor adstringente são removidos ou inativados no processamento (Berk, 1979). Dessa forma, o IPS e CPS poderiam ser utilizados para veicular isoflavonas em produtos de consumo diário da população, como pães, massas, produtos cárneos e sucos.



## **2. OBJETIVOS DO ESTUDO**

O presente estudo teve como objetivos específicos:

1. Realizar estudos de balanço de massa de isoflavonas no processamento em escala laboratorial de IPS e CPS;
2. Avaliar o perfil de distribuição de isoflavonas em cada etapa dos processamentos em escala laboratorial de IPS e CPS;
3. Avaliar a influência da concentração de etanol no perfil e concentração de isoflavonas de CPSs obtidos por precipitação com solução alcoólica.



### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Isoflavonas de soja

##### 3.1.1. Estrutura química e ocorrência em grãos de soja

As isoflavonas são flavonóides, compostos fenólicos heterocíclicos presentes em vegetais, que apresentam estrutura – C<sub>6</sub> - C<sub>3</sub> - C<sub>6</sub> –. Os flavonóides são classificados em flavonas, flavonóis, flavanonas, isoflavonas e leucoantocianidinas (Bobbio & Bobbio, 1995).

As isoflavonas diferenciam-se das demais estruturas dos flavonóides pelo fato de o ciclo benzênico (anel B) estar unido ao carbono 3 do heterociclo em vez do carbono 2, como mostra a Figura 1 (Kudou et al., 1991 b):

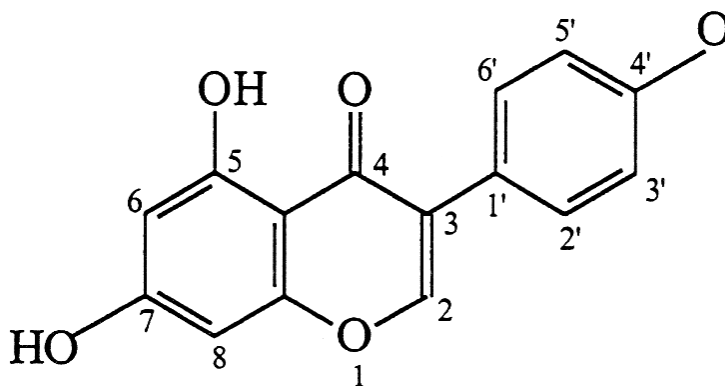


Figura 1: Estrutura química de isoflavona (Kudou et al., 1991 b).

Ainda de acordo com Kudou et al. (1991 b), a soja apresenta três tipos de isoflavonas agliconas: daidzeína (7, 4'-dihidroxiisoflavona), gliciteína (7, 4'-dihidroxi-6-metoxiisoflavona) e genisteína (5, 7, 4'-trihidroxiisoflavona), cujas estruturas químicas são apresentadas na Figura 2.





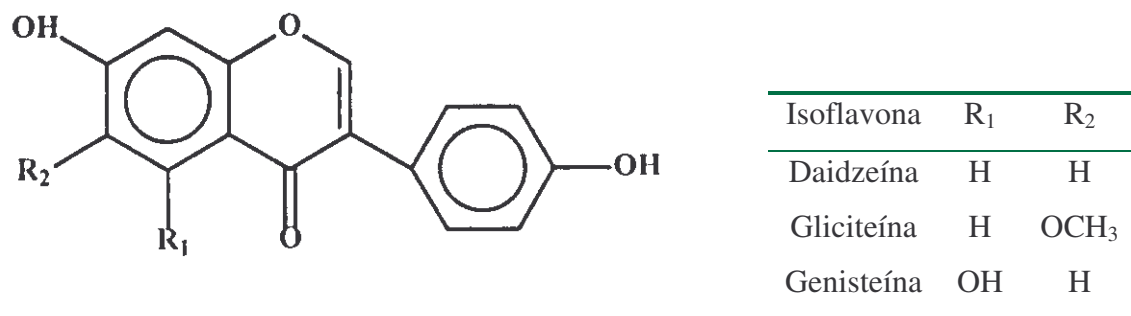
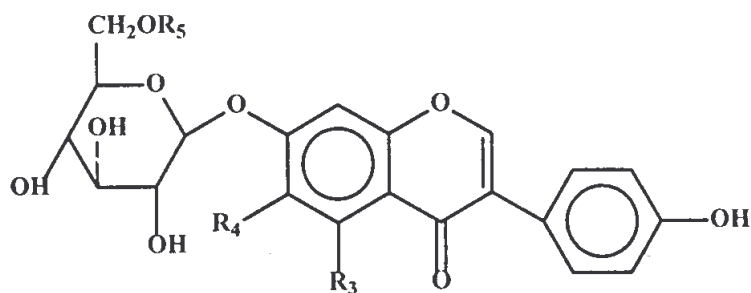


Figura 2: Estruturas químicas das isoflavonas agliconas da soja (Kudou et al., 1991 b).

Quando glicosiladas, ou seja, na forma de glicosil isoflavonas, são chamadas de daidzina, glicitina e genistina. Existem também as isoflavonas  $\beta$ -glicosídicas conjugadas, que se dividem em acetil glicosídeos e malonil glicosídeos, como mostra a Figura 3.



Isoflavona	R <sub>3</sub>	R <sub>4</sub>	R <sub>5</sub>
Daidzina	H	H	H
Glicitina	H	OCH <sub>3</sub>	H
Genistina	OH	H	H
6''-O- acetil daidzina	H	H	COCH <sub>3</sub>
6''-O- acetil glicitina	H	OCH <sub>3</sub>	COCH <sub>3</sub>
6''-O- acetil genistina	OH	H	COCH <sub>3</sub>
6''-O- malonil daidzina	H	H	COCH <sub>2</sub> COOH
6''-O- malonil glicitina	H	OCH <sub>3</sub>	COCH <sub>2</sub> COOH
6''-O-malonil genistina	OH	H	COCH <sub>2</sub> COOH

Figura 3: Isoflavonas glicosiladas de soja (Song et al., 1998).



Embora os flavonóides sejam encontrados em abundância nos tecidos vegetais, as isoflavonas estão presentes em poucas famílias botânicas, devido à distribuição limitada da enzima chalcona-isomerase, que converte 2 (R)-naringenina, um precursor de flavonas, em 2-hidroxicoumestrol (Coward et al., 1993). A soja contém altos teores de isoflavonas, podendo apresentar concentrações de até 4 mg/g b.u. (Wang & Murphy, 1994 a). As isoflavonas estão envolvidas em funções fisiológicas importantes para o crescimento e desenvolvimento dos grãos de soja, como por exemplo, resposta à infecção por *Phytophthora megasperma* (Graham et al., 1990, citados por Tsukamoto et al., 1995).

As concentrações de isoflavonas nos grãos são afetadas por fatores genéticos e ambientais: tipo de cultivar, local de plantio, clima, ano de safra, tipo de solo e as interações entre esses fatores (Hoeck et al., 2000). Elridge & Kwolek (1983) observaram que a concentração de isoflavonas variou de 1160 a 3090 µg/g b.u. entre quatro cultivares plantadas no mesmo local, e de 460 a 1950 µg/g b.u. entre quatro locais de plantio para uma mesma variedade. Wang & Murphy (1994 b), por sua vez, reportaram que a concentração total de isoflavonas variou de 1176 a 3309 µg/g b.u. entre as safras de diferentes anos plantadas no mesmo local, e de 1176 a 1749 µg/g b.u. entre locais de plantio num mesmo ano. Dessa forma, a influência do ano de safra parece ser maior do que a do local de plantio. Em relação à temperatura de desenvolvimento, Tsukamoto et al. (1995) concluíram que as sementes que se desenvolveram a temperaturas mais baixas apresentaram maiores concentrações de isoflavonas, e as maiores variações ocorreram nos cotilédones, e não no hipocótilo, cuja concentração de isoflavonas foi pouco afetada pela temperatura. Em relação aos cultivares, Wang & Murphy (1994 b) observaram que variedades japonesas, cultivadas em Iowa nas safras 1991-1992, apresentaram maiores teores de malonil glicetina e maiores razões entre malonil daidzina/daidzina e malonil genistina/genistina que algumas variedades americanas das safras de 1991-1992 cultivadas no mesmo estado. Em um estudo recente, Vyn et al. (2002) concluíram que o enriquecimento com sais de potássio de solos pobres nesse elemento promoveu um aumento do teor de daidzeína, genisteína e isoflavonas totais dos grãos de soja.

### 3.1.2. Alterações de isoflavonas durante o processamento de alimentos

As formas malonil daidzina e malonil genistina representam cerca de 66% do total de isoflavonas presentes nos grão de soja (Kudou et al., 1991 b). O hipocótilo apresenta alta concentração de isoflavonas, cerca de 5,5 a 6 vezes a mais que os cotilédones, mas devido às proporções de peso no grão (os cotilédones correspondem a 90% do peso do grão, enquanto a casca representa 8% e o hipocótilo, apenas 2%) (Bailey et al., 1935, citados por Elridge & Kwolek, 1983), o cotilédone contribui com 80 a 90% do total de isoflavonas do grão (Tsukamoto et al., 1995). A casca é praticamente isenta de isoflavonas. Glicitina e seus derivados  $\beta$ -conjugados estão presentes somente no hipocótilo (Elridge & Kwolek, 1983; Kudou et al., 1991 b). Os acetil glicosídeos conjugados são formados principalmente por degradação térmica das formas malonil glicosídicas durante o processamento dos grãos de soja e alimentos derivados (Farmakalidis & Murphy, 1985; Horowitz et al., 1989, citados por Kudou et al., 1991 b; Coward et al., 1998). As formas malonil glicosídeos também são instáveis em soluções aquosas ou alcoólicas, degradando-se a  $\beta$ -glicosídeos e outros compostos ainda não identificados mesmo sob estocagem refrigerada (Wang & Murphy, 1994 a; Barnes et al., 1994; Griffith & Collison, 2001).

Coward et al. (1993) analisaram isoflavonas em vários alimentos e ingredientes derivados de soja (leite de soja, tofu e farinha de soja) e verificaram que, quando não misturados a outros ingredientes ou tratados com álcool, a concentração total de isoflavonas variou entre 1,33 a 3,83 mg/g b.s., semelhante aos níveis encontrados em grãos de soja *in natura* (Elridge & Kwolek, 1983; Kudou et al., 1991 b). Por outro lado, o óleo de soja, produto largamente consumido no Brasil, não contém isoflavonas, o que indica que as mesmas permanecem retidas nos flocos de soja desengordurada durante a extração do óleo (Liu, 1999). Alimentos de soja fermentados orientais típicos, aos quais são adicionados cereais como centeio, arroz e trigo, contêm isoflavonas em concentrações menores do que o grão de soja, entre 0,36 - 1,38 mg/g b.s. (Coward et al., 1993). O molho de soja tipo *shoyu*, já bastante aceito na culinária ocidental, apresenta concentrações muito baixas de isoflavonas, de apenas 0,038 – 0,098 mg/g b.s. (Wang et al., 1990; Coward et al., 1993). Em geral, os alimentos fermentados orientais contêm predominantemente isoflavonas

agliconas, devido à hidrólise promovida por enzimas  $\beta$ -glicosidases microbianas (Murakami et al., 1984; Ikeda et al., 1995; citados por Esaki et al., 1999). Já em alimentos ou ingredientes de soja não fermentados, há predomínio dos  $\beta$ -glicosídeos conjugados (Wang & Murphy, 1994 a).

O Quadro 1 apresenta dados de concentração de isoflavonas em soja e derivados.

Quadro 1: Concentração de isoflavonas totais (µg/g b.u.) em soja e alimentos derivados.

Alimento	Concentração total de isoflavonas (µg/g b.u.)	Referência
Soja em grãos (Brasil)	425 – 1.415	Carrão-Panizzi & Kitamura (1995)
Soja em grãos (Japão)	688 – 2.389	Wang & Murphy (1994 b); Franke et al. (1995)
Soja em grãos (Coreia)	458 – 2.317	Choi et al. (1996).
Soja em grãos (EUA)	2.053 – 4.216	Wang & Murphy (1994 b)
Farinha desengordurada de soja (Brasil)	919 – 3.086	Genovese & Lajolo (2001) Aguiar (2004)
Farinha desengordurada de soja (EUA)	737 – 1.681	USDA (1999)
Proteína texturizada de soja (Brasil)	869 - 999	Genovese & Lajolo (2002)
Proteína texturizada de soja (EUA)	44 – 2.956	USDA (1999)
Isolado protéico de soja (Brasil)	1.384 – 1.637	Genovese & Lajolo (2001)
Isolado protéico de soja (EUA)	465 – 1.992	USDA (1999)
Concentrado protéico de soja (processo ácido)	612 – 1.670	Coward et al. (1993) USDA (1999)
Concentrado protéico de soja (processo alcoólico)	208 - 318	USDA (1999)
Leite de soja	12,6 – 211,3	USDA (1999)
Tofu	202 – 512	Coward et al. (1993); Wang & Murphy (1994 a)
Óleo de soja	Não contém	Murphy et al. (1999)
Molho de soja (shoyu)	1,3 – 23,0	Wang et al. (1990) Coward et al. (1993) Murphy et al. (1999)

Farinha de soja branca (não tostada) contém em sua maioria isoflavonas na forma de malonil glicosídeos conjugados (Barnes et al., 1994). CPSs obtidos por precipitação ácida apresentam concentrações de isoflavonas totais próximas a da matéria-prima (farinha ou farelo desengordurado de soja), enquanto que os produtos obtidos por precipitação alcoólica (etanol 65% v/v) apresentam concentrações muito baixas, de 10 a 20 vezes inferior à maioria dos alimentos de soja (Elridge, 1982; Coward et al., 1993), visto que os álcoois são excelentes solventes para as isoflavonas. Essas observações indicam que as isoflavonas apresentam forte afinidade com as proteínas e baixa solubilidade em água (Liu, 1999). Pandjaitan et al. (2000) realizaram um interessante estudo de balanço de massa de genistina e genisteína em processamento de CPS em escala laboratorial, por meio de precipitação ácida (pH 4,5), alcoólica (etanol 60% v/v) e por desnaturação térmica (aquecimento com água a 80 °C). O CPS obtido por precipitação ácida apresentou maior concentração de genistina e genisteína (0,742 mg/g b.s.), quando comparado ao obtido por aquecimento (0,671 mg/g) e àquele obtido por precipitação alcoólica (0,070 mg/g). As perdas de genistina e genisteína no processamento foram de 20,3%, 24,2% e 91,2% para os processos ácido, água quente e alcoólico, respectivamente. Houve aumento do percentual da forma aglicona nos concentrados obtidos por precipitação com água quente e com ácido (de forma mais intensa neste último processo), em comparação ao percentual original na matéria-prima. É possível que o período de imersão em água tenha promovido a conversão pela ação hidrolítica da própria  $\beta$ -glicosidase endógena da soja. A acidificação do meio também pode promover a hidrólise da ligação entre o açúcar e a aglicona.

Em relação aos IPSs, a concentração em produtos comerciais já foi estudada nos EUA por Elridge (1983), Seo & Mor (1984); Coward et al. (1993), Barnes et al. (1994), Wang & Murphy (1994), e no Brasil por Genovese e Lajolo (2001). Balanços de massa para o processamento em escala laboratorial de IPS foram estudados por Wang & Murphy (1996) e Wang et al. (1998). No primeiro estudo, o IPS foi obtido a partir de grãos de soja (previamente selecionados por seu alto teor de isoflavonas), os quais foram descascados, moídos e desengordurados. A farinha desengordurada foi submetida à extração alcalina a pH 8,5, filtração e precipitação a pH 4,5. O produto final apresentou retenção de cerca de 48% das isoflavonas da matéria-prima (farinha de soja não desengordurada), com uma

concentração de 1601 µg/g b.s.. A maior perda foi verificada no resíduo insolúvel da extração alcalina (52 % da isoflavonas originais). Já no estudo de Wang et al. (1998), houve a inclusão de uma etapa de lavagem do produto final, sendo essa etapa responsável pela maior perda (22% das isoflavonas originais), seguida do resíduo insolúvel (19% do total). O IPS obtido apresentou concentração de 1352 µg/g b.s., com retenção de 26% do total inicial. Em ambos os casos, houve aumento do percentual de agliconas nos produtos finais (de 27% a 40%, contra 1,5% a 2,0% na matéria-prima).

### **3.1.3. Extração e quantificação de isoflavonas de alimentos de soja**

As isoflavonas podem ser extraídas de soja e derivados com solventes orgânicos, tais como etanol 70% (Kudou et al., 1991 a e 1991 b); metanol 80% (Elridge, 1982; Barnes et al., 1994; Pandjaitan et al, 2000; Park et al.; 2002 a); acetonitrila 80% acidificada com 0,1% HCl (Barnes et al, 1994; Wang & Murphy, 1994 a). O tempo de extração adotado varia entre 1 a 24 horas, e a temperatura de extração entre 4 e 80 °C. Genovese e Lajolo (2001) comparando a eficiência de extração de isoflavonas de FSD usando soluções de metanol 70 e 80%; acetonitrila 60% e 80%, concluíram que o metanol 80% foi o melhor meio extrator em termos de rendimento e perfil cromatográfico. Aguiar (2004) avaliou a eficiência de extração de isoflavonas usando soluções aquosas de etanol 30-100% e de metanol 70-100%. A extração com metanol 80% foi significativamente superior (para  $\alpha=0,05$ ) em relação aos demais meios avaliados. Esse mesmo autor comparou ainda a eficiência de extração de isoflavonas usando como solvente etanol 60% (acidificado e não-acidificado), metanol 80% (acidificado e não acidificado), acetonitrila acidificada e acetonitrila com dimetilsulfóxido. O uso da combinação acetonitrila/dimetilsulfóxido (20:1) apresentou maior capacidade de extração de isoflavonas que metanol 80%, porém esse sistema emprega solventes de alta toxicidade, o que poderia restringir seu emprego comercial na indústria de alimentos (Aguiar, 2004). Por outro lado, a acidificação promoveu aumento da extração, entretanto, pode hidrolisar os  $\beta$ -glicosídeos conjugados, alterando assim o perfil de distribuição original das isoflavonas (Genovese e Lajolo, 2001).



Até 1991, a maioria dos trabalhos adotava a extração com solventes orgânicos à quente (60 a 80 °C), mas Kudou et al. (1991 b) verificaram que a essas temperaturas, ocorria degradação das formas malonil glicosídeos a  $\beta$ -glicosídeos, alterando-se assim o perfil original de distribuição das isoflavonas durante o processo de extração. Em 1998, Coward et al. realizaram um estudo com metanol 80% para avaliar a extração e perfil de distribuição de isoflavonas a 4 , 25 e 80 °C, e concluíram que a temperatura de 4 °C propiciava maior recuperação de isoflavonas totais e malonil glicosídeos.

A proporção entre solvente de extração e produto de soja mais utilizada é de 10 mL de solvente para cada 1 grama de produto de soja em pó. Amostras líquidas devem ser liofilizadas e moídas antes da extração (Wang & Murphy, 1994 a).

O método mais comum de análise e quantificação de isoflavonas é a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), utilizando-se colunas de fase reversa e detectores de ultravioleta, seguidos ou não de espectrômetros de massa. Os sistemas de solventes mais usados são gradientes de metanol puro/água acidificada ou acetonitrila/água acidificada (Merker & Beecher, 2000). Alguns autores têm utilizado também Cromatografia Gasosa – Espectrometria de Massa (Liggins et al, 1998; Ghosh & Fenner, 1999), mas somente para determinação de agliconas.

#### **3.1.4. Absorção e metabolismo de isoflavonas**

Vários estudos têm sido conduzidos ao longo dos últimos anos para esclarecer os fatores determinantes na absorção, metabolismo e biodisponibilidade de isoflavonas de soja.

A atividade biológica e o metabolismo das isoflavonas ingeridas na dieta dependem da forma química em que se apresentam (Munro et al., 2003). As agliconas são absorvidas mais rapidamente que as isoflavonas glicosiladas (Xu et al., 1995; Izumi et al., 2000), devido à maior massa molecular e maior hidrofiliabilidade destas últimas (Brown, 1998, citado por Xu et al., 1995).

Após a ingestão, as formas malonil glicosídicas e acetil glicosídicas são metabolizadas a  $\beta$ -glicosídeos, os quais sofrem hidrólise pelas  $\beta$ -glicosidases produzidas pelas bactérias intestinais, havendo a liberação de glicose e agliconas (Setchell et al., 2002 a; Izumi et al., 2000). Os principais grupos de bactérias intestinais produtoras de  $\beta$ -glicosidases ativas sobre os flavonóides da dieta são *Lactoabacilli*, *Bacteroides* e *Bifidobacteria* (Hawksworth et al., 1971, citados por Xu et al., 1995). O ácido clorídrico do estômago pode promover a hidrólise a agliconas (Xu et al., 1995), bem como as  $\beta$ -glicosidases ligadas às membranas das células intestinais, mas a participação desses processos é mínima em comparação à hidrólise promovida pelas enzimas bacterianas (Setchell, 2001). Setchell et al. (2002 a) demonstraram que, após a ingestão de daidzina e genistina, seja na forma purificada em tabletes ou presentes em leite de soja, são detectadas no plasma apenas as formas agliconas e seus conjugados glucuronídeos e sulfatos, o que indica que as isoflavonas glicosiladas não são absorvidas intactas pelo intestino sem hidrólise a agliconas. A daidzeína pode ainda ser metabolizada pela microbiota intestinal a O-desmetilangolensina e equol, via seus respectivos intermediários, dihidroxidaidzeína e dehidroequol (Figura 4). Similarmente, a genisteína pode ser metabolizada a 6'-hidroxi-O-desmetilangolensina (Figura 5) e posteriormente, a p-etil-fenol (Goldwin et al., 2000; citados por Munro et al.; 2003). Metabólitos de gliciteína foram recentemente identificados na urina humana por Heinonen et al. (2000) como 5'-OH-O-desmetilangolensina e 5'-metoxi-O-desmetilangolensina.

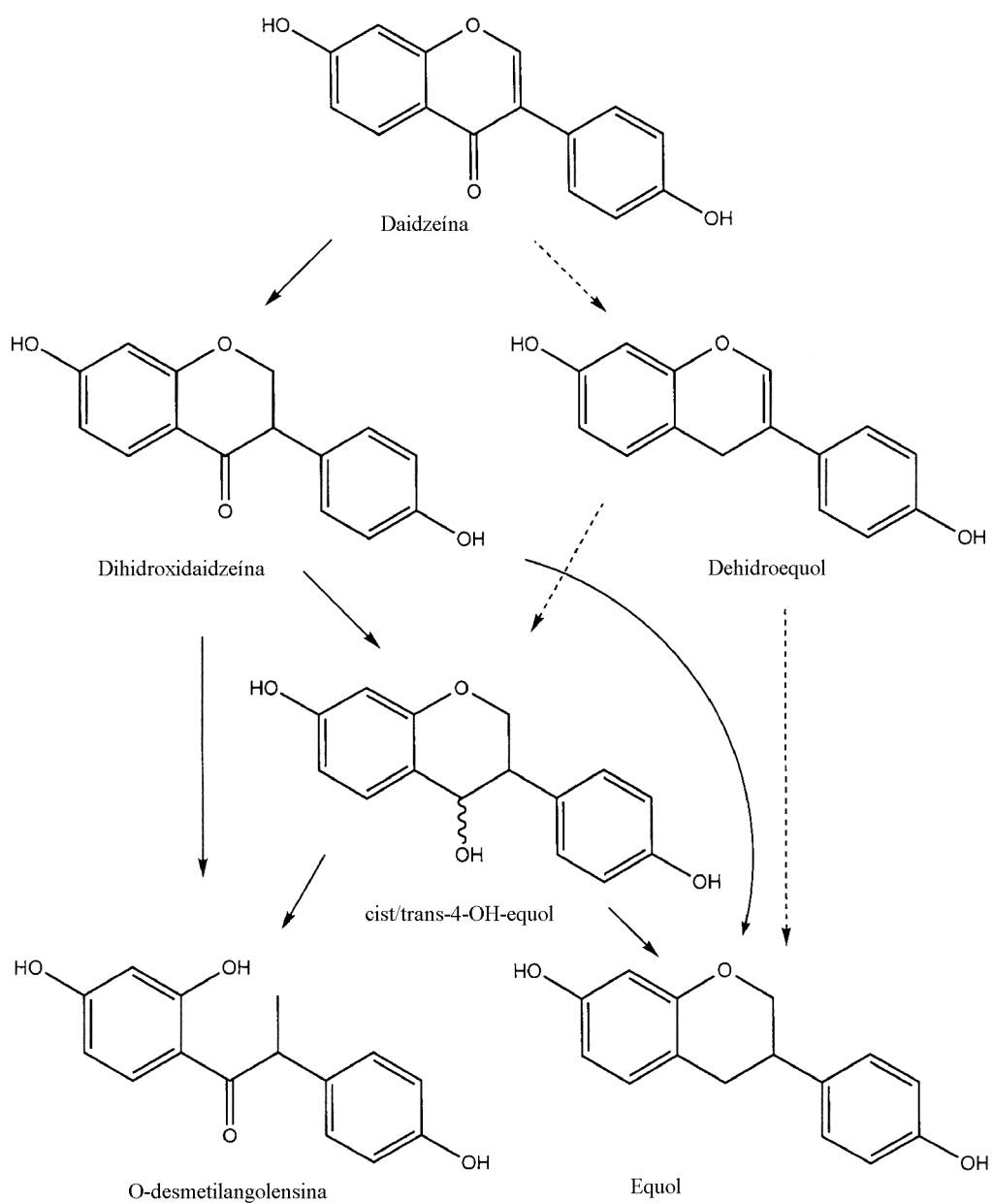


Figura 4: Rotas metabólicas para daidzeína (Heinonen et al., 1999).



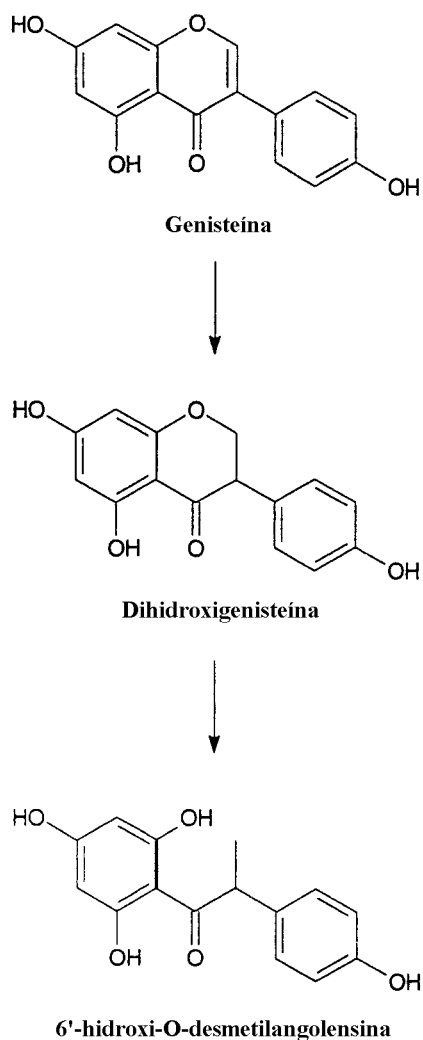


Figura 5: Metabolismo da genisteína (Joannou et al., 1995).

Após absorção, as agliconas e seus metabólitos são conjugados no fígado com ácido glucurônico ou sulfatos, circulando enterohepaticamente, podendo sofrer reabsorção no intestino, e são excretadas predominantemente na urina em até 48 horas após a ingestão (Setchell, 2000). As isoflavonas não absorvidas são excretadas na forma não conjugada nas fezes (Adlercreutz et al., 1995; citados por Munro et al., 2003), assim como parte do equol produzido pelas bactérias intestinais a partir da daidzeína (Watanabe et al., 1998; Xu et al., 2000). As formas glucuronídeo-conjugadas, predominantes no plasma e urina (Zhang et al., 2003), representam até 90% das isoflavonas circulantes no plasma humano (Adlercreutz et



al., 1995, citado por Messina, 1999), porém são consideradas biologicamente inativas (Cassidy, 1996, citado por Munro et al., 2003). As formas sulfato conjugadas, presentes em menores concentrações no plasma (cerca de 5% do total), são consideradas as formas ativas. As agliconas também são encontradas no plasma, perfazendo até 20% do total presente na circulação, e podem ser detectadas também na urina (Zhang et al., 2003). Os picos de concentração no plasma são observados, geralmente, entre 4 a 8 h após ingestão (Setchell, 2000).

A Figura 6 resume as principais biotransformações ocorridas no metabolismo de isoflavonas em humanos e animais (Setchell & Cassidy, 1999):

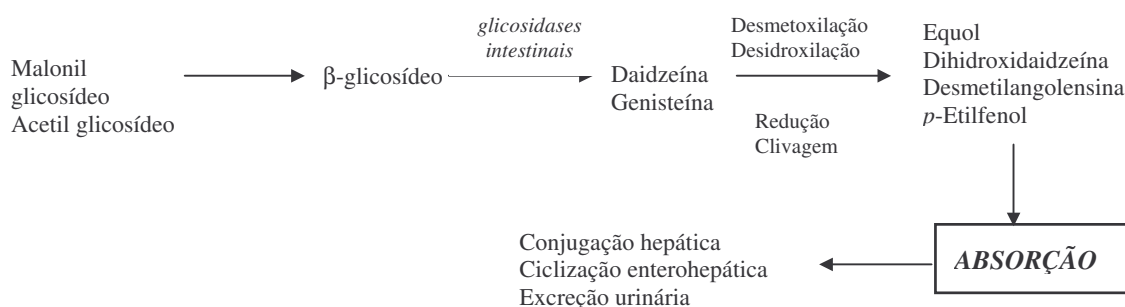


Figura 6: Principais biotransformações do metabolismo de isoflavonas em humanos e animais (Setchell & Cassidy, 1999).

A microbiota intestinal exerce papel chave sobre a biodisponibilidade das isoflavonas, por seu papel na hidrólise de β-glicosídeos a agliconas (Xu et al., 1995), pela formação de metabólitos como o equol (Setchell et al., 2002 b) e pela degradação das agliconas por ruptura do anel C a metabólitos ainda não identificados (Griffith & Smith, 1972; citados por Xu et al., 1995; Setchell et al., 2003).

As bactérias intestinais são as principais responsáveis pela biodisponibilidade das isoflavonas glicosiladas, pois sem a hidrólise de ligação entre açúcar e aglicona, praticamente não ocorreria absorção (Setchell et al., 2003).





A formação de equol a partir de daidzeína é de grande relevância no estudo da atividade biológica das isoflavonas, uma vez que (i) o equol é um antioxidante mais potente que as demais isoflavonas (Setchell et al., 2002 b), (ii) seu potencial estrogênico é cerca de dez vezes maior que o de seu precursor, daidzeína (Shutt & Cox, 1972; citados por Setchell & Cassidy, 1999) e (iii) seu tempo de permanência na circulação é maior do que o da daidzeína ou da O-desmetilangolensina, podendo ser detectado na urina até 5 dias após a ingestão de alimentos de soja, enquanto que as isoflavonas são totalmente excretadas em até 48 h (Slavin et al., 1998). Entretanto, apenas cerca de 30% da população adulta é capaz de metabolizar equol a partir de daidzeína (Munro et al., 2003), fato atribuído às diferenças na microbiota intestinal. Pessoas que não produzem equol podem adquirir essa capacidade ao serem estimuladas com uma dieta contendo produtos de soja (Wu & Anderson, 1999), e, aparentemente, os indivíduos que produzem equol mantêm essa capacidade se mantiverem a ingestão de isoflavonas, a menos que haja uma mudança radical na microbiota, como por exemplo, quando do uso de antibióticos (Setchell et al., 2002 b). Crianças com menos de 4 meses de vida, cuja microbiota intestinal não está plenamente desenvolvida, não são capazes de produzir equol a partir de isoflavonas contidas em leite de soja (Slavin et al., 1998; Setchell & Cassidy, 1999).

A dieta também pode influenciar a produção de equol: dietas ricas em carboidratos e fibras, que favorecem a fermentação no intestino, aumentam a produção de equol (Setchell & Cassidy, 1999). A ingestão de prebióticos, como os frutooligossacarídeos, aumenta a extensão de hidrólise de daidzina a daidzeína, por promover o crescimento de bifidobactérias produtoras de  $\beta$ -glicosidases, liberando dessa forma maior quantidade de substrato para a produção de equol (Uehara et al., 2001). A identificação das espécies de bactérias responsáveis pela conversão de daidzeína a equol é um grande desafio, dado o número de bactérias residentes no cólon e intestino delgado. Já foram isoladas a partir da microbiota fecal 3 espécies de bactérias capazes de converter, *in vitro*, daidzeína pura a equol: os gram-positivos *Streptococcus intermedius* spp. e *Ruminococcus productus* spp.; e o gram-negativo *Bacteroides ovatus* spp.

As agliconas são mais susceptíveis que as isoflavonas glicosiladas à degradação bacteriana por clivagem do anel C, pois a molécula de glicose atua como um grupo protetor (Setchell et al., 2001). A genisteína, por possuir um grupo OH na posição 5, é mais susceptível à clivagem que a daidzeína, o que pode ser um fator limitante na absorção de genisteína (Xu et al., 1995). Ao incubarem anaerobicamente agliconas puras com fezes humanas, Xu et al. (1995) observaram completo desaparecimento da genisteína e daidzeína após 18 e 72 h de incubação, respectivamente, resultado que confirma a maior susceptibilidade da genisteína à degradação bacteriana.

### **3.1.5. Biodisponibilidade de isoflavonas**

O FDA (2003) define biodisponibilidade como “a taxa e extensão nas quais o ingrediente ativo ou a molécula ativa é absorvida de sua matriz e se torna disponível para o sítio de ação”. Como no caso das isoflavonas as atividades biológicas ainda estão sendo confirmadas e estudadas, não foram estabelecidos “sítios de ação” ou mesmo os “ingredientes ativos”, uma vez que cada aglicona pode produzir diversos metabólitos. Dessa forma, a biodisponibilidade das isoflavonas, como a maioria dos ingredientes nutracêuticos, têm sido avaliada pelas concentrações desse compostos e seus metabólitos no plasma e excreção via urina (Uzzan & Labuza, 2004).

Vários pesquisadores têm trabalhado no intuito de esclarecer como a farmacocinética e metabolismo de isoflavonas de soja no organismo humano são afetados pela idade, sexo, tipo e duração da dieta ou a fonte de isoflavonas (Quadro 2).

Quadro 2.: Resumo de estudos sobre farmacocinética e metabolismo de isoflavonas de soja.

Grupo estudado	Fonte e forma de administração	Tempo de exposição	Ingestão diária (expressa em agliconas)	Concentração medida em	Resultados e conclusões	Fonte
7 mulheres adultas	Leite de soja nas 3 refeições principais	3 dias, repetição após 3 semanas	3,4; 6,9 e 10,3 $\mu\text{mol/kg}$ de peso corporal	Plasma, urina e fezes	a. Resultados dose-dependentes b. Biodisponibilidade variando entre 13-35%	Xu et al. (1995)
6 homens e 6 mulheres adultos	Leite de soja, 3 porções ao dia	33 dias	80-120 mg	Plasma e urina	a. Ingestão de GIN > DIN b. Maior excreção de DIN e seus metabólitos que de GIN e metabólitos c. Biodisponibilidade de DIN > GIN	Lu & Anderson, (1998)
1. 30 homens e 30 mulheres adultos 2. 17 homens 3. 10 homens e 4 mulheres	1. Bebida de soja 1 vez ao dia 2. <i>Tempeh</i> ou grãos de soja 3. Proteína de soja	1. 4 dias 2. 9 dias 3. 9 dias, 4 repetições com intervalos de 10 dias	1. 38 mg 2. nd 3. 0 a 36 mg	Urina	1. Maior conteúdo de fibra na dieta favorece produção de equol 2. Maior recuperação de IF e metabólitos na urina no grupo que consumiu produto fermentado ( <i>tempeh</i> ) 3. Concentrações de IF e metabólitos na urina direta e linearmente proporcionais à dose ministrada	Slavin et al., (1998)
7 homens adultos	60 g de kinako no café da manhã	1 dia	125 $\mu\text{mol}$	Plasma, urina e fezes	a. Meia-vida de GIN e DIN no plasma: 8,4 e 5,8 h b. Maior excreção na urina de DIN e seus metabólitos que de GIN e metabólitos	Watanabe et al., (1998)
7 homens e 7 mulheres adultos	Leite de soja ou germen de soja em pó no café da manhã	1 dia, repetição após 1 semana	4,5 $\mu\text{mol/kg}$ de peso corporal	Plasma e urina	a. Biodisponibilidade de GIN e DIN similar para homens e mulheres b. GLIN menos biodisponível	Zhang et al., (1999)

Quadro 2: Resumo de estudos sobre farmacocinética e metabolismo de isoflavonas de soja (continuação).

Grupo estudado	Fonte e forma de administração	Tempo de exposição	Ingestão diária (expressa em agliconas)	Concentração medida em	Resultados e conclusões	Fonte
1. 4 homens e 4 mulheres adultos 2. 8 homens adultos	1. Tabletes de IFA ou de IFG, ingeridos após o café da manhã 2. Tabletes de IFA ou IFG após as 3 refeições	1. Dose única, 4 repetições com intervalos de 2 meses 2. 4 semanas	1. 30 e 450 mg 2. 80 mg	Plasma	a. IFA absorvidas mais rapidamente e em maior quantidade que IFG (picos no plasma depois de 2 e 4 h, respectivamente) b. Tabletes: concentração de DIN > GIN c. Concentrações de GIN superiores às de DIN no plasma d. Biodisponibilidade de GIN > DIN	Izumi et al. (2000)
1. 7 mulheres idade pré-menopausa 2. 10 mulheres idade pré-menopausa	1. Leite de soja, 4 vezes ao dia. Grupos a: dieta base; b: dieta livre escolha em horários fixos; Grupo c: dieta e horários livre escolha 2. Tofu, tempeh, grãos de soja ou proteína texturizada no café da manhã	1. 1 dia 2. 1 dia	1. 0,9 mg/kg de peso corporal. 2. 0,8-1,4 mg/kg peso corporal	Plasma, urina e fezes	1. Concentrações de DIN, GIN e metabólitos no plasma não foram afetados pela dieta 2a. Para os diferentes alimentos de soja, a recuperação de DIN, GIN e metabólitos na urina foi similar. 2b. Maior excreção de DIN e seus metabólitos que de GIN e metabólitos	Xu et al. (2000)
19 mulheres idade pré-menopausa	IF purificadas em tabletes após o café da manhã	1 dia	50 mg	Plasma e urina	a. IFA e IFG totalmente absorvidas b. Ingestão de IFA gera picos no plasma após 5,2 (GIN) e 6,6 h (DIN) c. Ingestão de IFG gera picos no plasma após 9,3 (GN) e 9,0 h (DN)	Setchell et al. (2001)

Quadro 2: Resumo de estudos sobre farmacocinética e metabolismo de isoflavonas de soja (continuação).

Grupo estudado	Fonte e forma de administração	Tempo de exposição	Ingestão diária (expressa em agliconas)	Concentração medida em	Resultados e conclusões	Fonte
6 mulheres adultas, européias	Bebida enriquecida com gérmen de soja, IFG ou IFA	1 dia	1 mg/kg de peso corpóreo	Plasma e urina	a. Hidrólise no alimento de IFG a IFA não aumentou velocidade de absorção ou concentrações no plasma b. Biodisponibilidade de IFA e IFG semelhante	Richelle et al., (2002)
15 mulheres americanas	IFA e IFG em tabletes no café da manhã	1 dias	250 mg	Plasma	Biodisponibilidade de IFG e IFA semelhante	Zubik & Meydani (2003)
10 mulheres americanas: 5 em idade pré-menopausa e 5 em idade pós-menopausa	Grãos de soja tostados, dose única ao dia	1 dia	15, 30 e 60 mg	Plasma e urina	a. Não houve diferença na biodisponibilidade devido à idade b. O aumento da dose ingerida diminui o percentual excretado na urina c. Meia-vida no plasma: 8,1 h para DIN e 10,1 h para GIN.	Setchell et al. (2003)

Legenda

DIN: Daidzeína

DN: Daidzina

GIN: Genisteína

GLIN: Gliciteína

GN: Genistina

IF: Isoflavonas

IFA: Isoflavonas agliconas

IFG: Isoflavonas glicosiladas

nd: não determinado

A análise dos dados do Quadro 2 indica que ainda não há consenso sobre quais formas seriam mais biodisponíveis (isoflavonas agliconas ou glicosiladas). Xu et al. (1995) e Setchell et al. (2002 a) demonstraram que, sem a ação das  $\beta$ -glicosidases produzidas pelas bactérias intestinais, praticamente não haveria absorção de isoflavonas glicosiladas. Izumi et al. (2000), em estudo com 4 mulheres e 4 homens adultos que ingeriram isoflavonas concentradas na forma tabletes, constataram que as isoflavonas agliconas são absorvidas mais rapidamente e em maior quantidade que as isoflavonas glicosiladas, resultado que sugere que as formas agliconas seriam as mais biodisponíveis. Slavin et al. (1998) compararam a absorção de isoflavonas presentes em *tempeh* (produto fermentado, rico em agliconas) e de soja em grão, rica em glicosídeos, mas pobre em agliconas, e também concluíram que as agliconas são mais biodisponíveis com base na recuperação de isoflavonas e metabólitos excretados na urina. Entretanto, Setchell et al. (2003), ao avaliarem a biodisponibilidade de isoflavonas purificadas administradas na forma de tabletes para um grupo de 19 mulheres, concluíram que as isoflavonas glicosiladas são as formas mais biodisponíveis, com base na área sobre a curva do gráfico de concentração de isoflavonas e metabólitos no plasma em função do tempo. Por outro lado, Richelle et al. (2002) e Zubik & Meydani (2003) não encontraram diferença na biodisponibilidade de isoflavonas agliconas e isoflavonas glicosiladas quando administradas em leite de soja ou na forma de tabletes em estudo com 15 mulheres americanas adultas.

As agliconas são mais vulneráveis que as isoflavonas glicosiladas à degradação bacteriana, o que poderia ser um fator limitante para a disponibilidade das agliconas (Setchell, 2001). Dentre as agliconas, a genisteína apresenta a maior biodisponibilidade (Setchell et al., 2003; Richelle et al., 2002; Setchell et al., 2002), seguida por daidzeína e gliciteína (Zhang et al., 1999; Setchell et al., 2003). Embora Lu & Anderson (1998) tenham concluído que a daidzeína seria mais biodisponível que a genisteína com base na taxa de recuperação na urina, esse resultado é contestado por outros autores como Setchell (2001) e Setchell et al. (2002 a; 2003), que defendem as concentrações no plasma como indicadores de biodisponibilidade, uma vez que ainda não são conhecidos todos os metabólitos das isoflavonas, e sua forma de excreção (urina ou fezes). A meia-vida de genisteína no plasma se mostrou superior à da daidzeína nos estudos de Watanabe et al (1998) e de Setchell et al.

(2003), fato que contribui para a maior biodisponibilidade da genisteína em relação a daidzeína (Setchell et al., 2003).

A idade parece não afetar a biodisponibilidade e o metabolismo de isoflavonas, com exceção de crianças com menos de 4 meses, cuja microbiota intestinal não se encontra plenamente desenvolvida e, portanto, não são capazes de metabolizar equol (Setchell & Cassidy, 1999). Setchell et al. (2003) avaliaram a biodisponibilidade de isoflavonas de soja com mulheres em idade pré e pós-menopausa, e não encontraram diferenças significativas entre os dois grupos.

Estudos sobre diferenças na biodisponibilidade relacionadas ao sexo não são conclusivos. Lu & Anderson (1998) observaram que, nos casos de administração de dietas à base de soja por períodos prolongados, o tempo de meia-vida de excreção de isoflavonas diminuiu para mulheres, mas aumentou progressivamente para homens. Zhang et al. (1998) não observaram diferença na biodisponibilidade de isoflavonas comparando as concentrações de isoflavonas e metabólitos no plasma de homens e mulheres após ingestão de quantidade padronizada de isoflavonas.

A dieta e estado físico do indivíduo podem afetar a biodisponibilidade de isoflavonas. Doenças intestinais ou uso de antibióticos diminuem a biodisponibilidade das formas glicosiladas, uma vez que há redução da produção de  $\beta$ -glicosidases microbianas (Munro et al., 2003). Dietas ricas em fibras favorecem a fermentação, bem como os probióticos, podendo intensificar a produção de equol nos indivíduos considerados “produtores de equol” (Setchell & Cassidy, 1999; Slavin et al., 1998; Uehara et al. 2001). Frutooligossacarídeos estimulam o crescimento de bifidobactérias, produtoras de  $\beta$ -glicosidases, o que aumenta a absorção e biodisponibilidade de isoflavonas glicosiladas (Uehara et al., 2001). Por outro lado, Xu et al. (2000) não encontraram diferenças na biodisponibilidade de isoflavonas de leite de soja quando administradas a mulheres adultas em conjunto com 3 tipos de dietas diferentes: (i) dieta base, escolhida pelos pesquisadores; (ii) dieta de livre escolha em horários controlados; (iii) dieta de livre escolha, sem controle de horários. A quantidade e horários de ingestão de isoflavonas nos 3 grupos foram as

mesmas, e as dietas diferiram entre si quanto ao conteúdo calórico, percentual de proteínas e de gordura, mas não quanto ao percentual de fibras solúveis e insolúveis, o que poderia explicar a biodisponibilidade similar para os 3 grupos.

A influência da fonte de isoflavonas (tipo de alimento de soja) na biodisponibilidade não está totalmente esclarecida. Enquanto Slavin et al. (1998) concluíram que isoflavonas de alimentos fermentados eram mais biodisponíveis que os de grãos de soja cozidos, Xu et al. (2000) não constataram diferenças na biodisponibilidade de isoflavonas provenientes de tofu, *tempeh*, grãos de soja e proteína texturizada de soja. Setchell (2000) constatou que a velocidade de excreção de isoflavonas é maior quando ingerida de alimentos líquidos do que quando ingeridas em matrizes sólidas. Faltam ainda estudos comparativos sobre biodisponibilidade de isoflavonas presentes em alimentos de soja e em suplementos farmacêuticos (Setchell et al., 2003).

Existe uma certa dificuldade na realização de estudos conclusivos sobre biodisponibilidade de isoflavonas. A grande variabilidade do metabolismo intra-individual e interindividual, causada pelas diferenças na microbiota intestinal, tempo de trânsito dos alimentos no trato gastro-intestinal, pH e potencial redox do intestino (Munro et al., 2003) exige várias repetições, multiplicando o número de coletas de amostra e de análises, o que limita o número de indivíduos por estudo por questões de custo (Setchell et al., 2003).

### **3.1.6. Atividades biológicas das isoflavonas de soja**

As isoflavonas têm sido estudadas por suas propriedades biológicas, tais como a atividade estrogênica (Murphy, 1982), antiestrogênica (especialmente sobre os sintomas da síndrome de climatério e da osteoporose) (Molteni et al., 1995; Potter et al., 1998; Dalais et al., 1998), hipocolesterolêmica (Anthony et al., 1997) e anticarcinogênica (Coward et al., 1993; 1998; Kim et al., 1998). Alguns estudos apontam ainda atividade antifúngica (Naim et al., 1974), anti-hemolítica *in vitro* (Naim et al., 1976) e atividade antioxidante *in vitro* (Naim et al., 1976) e *in vivo* (Kulling et al., 2001).



### 3.1.6.1. Atividade estrogênica e antiestrogênica

O interesse inicial da comunidade científica em isoflavonas foi focado na atividade estrogênica destes compostos, que apresentam semelhança com o hormônio feminino 17- $\beta$ -estradiol (Figura 7).

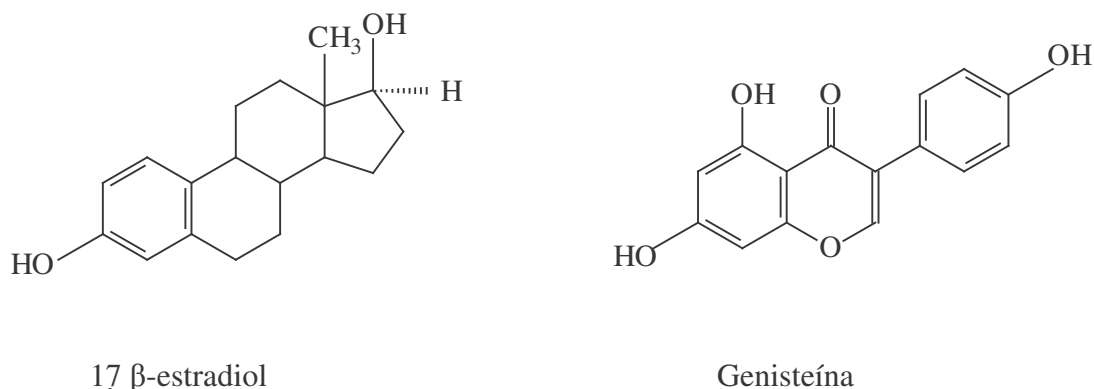


Figura 7: Similaridade entre estruturas químicas do estrógeno fisiológico 17- $\beta$ -estradiol e a isoflavona genisteína (Kim et al, 1998).

As isoflavonas são fracamente estrogênicas, apresentando atividades entre  $1 \times 10^{-4}$  a  $1 \times 10^{-2}$  da atividade estrogênica do 17  $\beta$ -estradiol em base molar (Messina, 2000). Apesar da baixa atividade em comparação aos estrógenos femininos, as isoflavonas podem exercer efeitos fisiológicos, uma vez que os níveis de isoflavonas no soro de pessoas que consomem produtos de soja regularmente podem chegar a 1000 vezes a concentração dos estrogênios endógenos (Adleurcetz et al. 1993). Além disso, a genisteína apresenta maior afinidade pelos receptores de estrogênio subtipo  $\beta$  (ER $\beta$ , localizados nos ossos e sistemas vasculares) do que pelos receptores subtipo  $\alpha$  (ER $\alpha$ , localizados principalmente no útero e mama (Tabela 1). Essa diferença de afinidade pode explicar a ação das isoflavonas no combate a osteoporose, sintomas de menopausa e vasoconstrição (Kuiper, 1998; Messina, 2000).



Tabela 1: Afinidade relativa de alguns fitoestrógenos pelos receptores ER $\alpha$  e ER $\beta$ .

<i>Composto</i>	<i>ER<math>\alpha</math></i>	<i>ER<math>\beta</math></i>
17 $\beta$ -estradiol	100	100
Coumestrol	20	140
Isoflavonas		
Genisteína	4	87
Daidzeína	0,1	0,5
Flavonas		
Apigenina	0,3	6
Flavonóis		
Campferol	0,1	3
Quercetina	0,01	0,04

Fonte: Kuiper et al. (1998)

A Figura 8 ilustra a distribuição anatômica dos ER $\alpha$  e ER $\beta$  (Setchell & Cassidy, 1999). É interessante notar que os ER $\beta$  são encontrados no cérebro, ossos, bexiga e epitélio vascular, tecidos que normalmente respondem à terapia de reposição hormonal (TRH) convencional (Setchell & Cassidy, 1999).



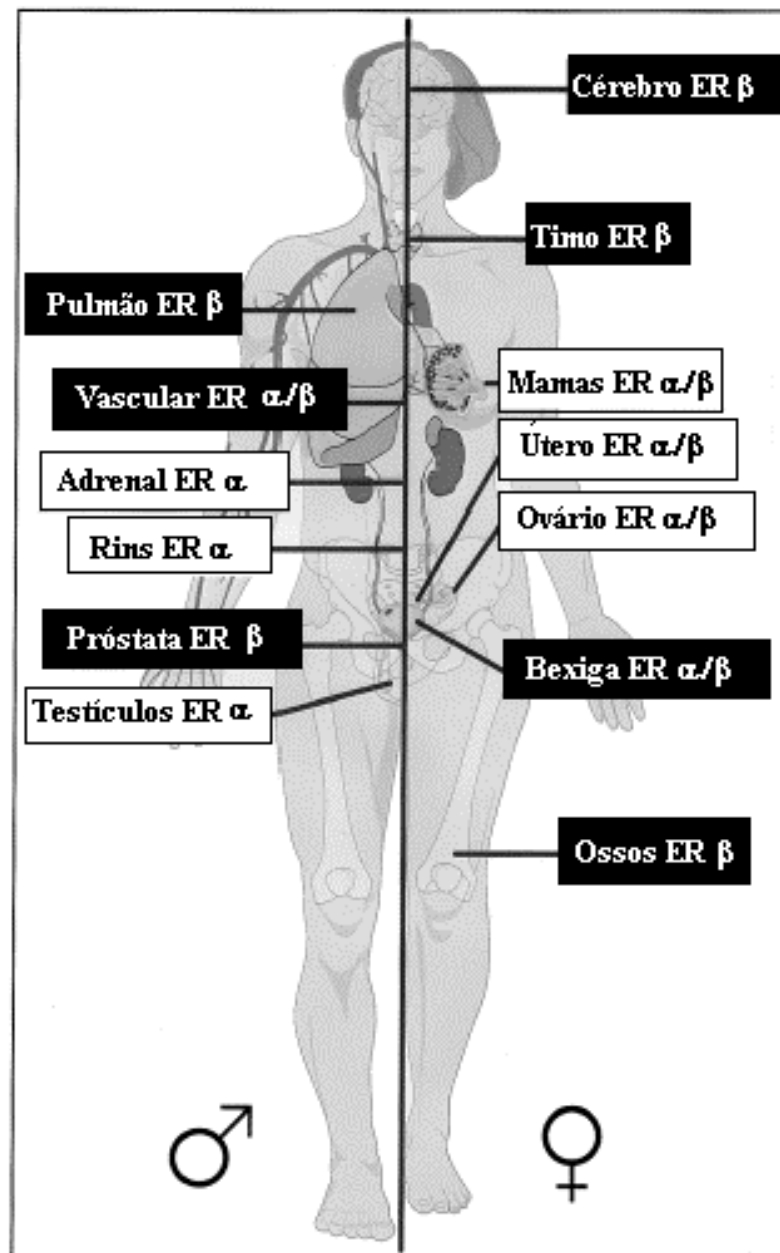


Figura 8: Distribuição anatômica dos receptores de estrogênio ER $\alpha$  e ER $\beta$  (Setchell & Cassidy, 1999).



As isoflavonas podem atuar como antiestrógenos quando os níveis de estrogênio são altos, como no caso das mulheres em idade pré-menopausa, e como agonistas de estrogênio quando os níveis deste são baixos, como no caso das mulheres em idade pós-menopausa. Por essas características, alguns pesquisadores têm classificado as isoflavonas como moduladores seletivos dos receptores de estrogênio (Messina, 2000), cuja sigla em inglês é *SERMs* (*Selective Estrogen Receptor Modulators*).

A atividade estrogênica das isoflavonas pode exercer efeitos sobre a síndrome do climatério, osteoporose e desenvolvimento de células cancerosas.

#### **3.1.6.1.1. Isoflavonas e a síndrome do climatério (sintomas de menopausa)**

A incidência de sintomas de menopausa tais como suores noturnos e “calores” (sensação de ondas de calor) na população feminina japonesa é de cerca de um terço da incidência observada na população feminina americana (Lock, 1994; citado por Messina, 1999). Adlercreutz et al. (1991) sugeriram que essa diferença poderia ser atribuída ao consumo de soja e alimentos à base de soja pela população japonesa.

Os resultados de diversos estudos focados no efeito das isoflavonas sobre os sintomas de menopausa ainda são controversos. Woods et al. (1996) e Dalais et al. (1996) reportaram que o consumo de soja por mulheres em idade menopausal exerceu efeito mínimo (não significativo) na redução de frequência ou severidade dos episódios de “calores”. Burke (1996), por sua vez, observou que o consumo diário de 20 g de proteína de soja contendo, 34 mg de isoflavonas, reduziu modesta, mas significativamente, a severidade dos ataques, mas sem alteração na frequência. Harding et al. (1996) por sua vez, reportaram redução na frequência de “calores” em resposta ao consumo de soja correspondente a uma ingestão diária de 80 mg de isoflavonas. Woods (1996) não observou redução na frequência ou severidade de ataques de “calores” em mulheres em idade pós-menopausa com a suplementação da dieta de 45 mg isoflavonas/dia. Han et al. (2000) avaliaram os efeitos da suplementação de isoflavonas no alívio dos sintomas da síndrome

do climatério em mulheres na cidade de São Paulo. O grupo estudo (40 indivíduos) recebeu, durante 16 semanas, 3 cápsulas diárias contendo 33 mg de isoflavonas (100 mg/dia), enquanto o grupo controle (também 40 indivíduos) recebeu placebo. Ao final do estudo, 80% das mulheres do grupo estudo apresentou melhora em relação aos sintomas de menopausa, avaliados pelo índice de Kupperman, enquanto que no grupo controle, a melhora foi de apenas 12,5%. Messina & Hughes (2003) revisaram 19 estudos clínicos sobre o efeito de isoflavonas nos sintomas de menopausa, concluindo que as isoflavonas podem promover uma redução modesta na frequência de ataques de “calores” somente nos casos mais severos, em que o número médio de episódios era superior a 5 por dia. Um estudo recente feito no Brasil por Laudanna (2004) com 98 mulheres (que apresentavam graves sintomas da síndrome da menopausa) comparou os efeitos da ingestão de um alimento de soja rico em isoflavonas (90 mg isoflavonas/dia) e da TRH convencional sobre o índice de Kupperman. A redução observada nos grupos estudados foi semelhante, com uma vantagem adicional para o tratamento com isoflavonas, que não causou efeitos colaterais como dores no peito ou tromboflebite, observados no grupo que recebeu TRH.

Em revisão sobre o tema, Messina (2000; 2004 a) concluiu que ainda não existem estudos clínicos suficientes para indicar o consumo de isoflavonas como substituto total a TRH convencional, mas recomenda o consumo de soja como auxiliar na dieta para as mulheres que evitam a TRH devido aos seus efeitos colaterais, como o aumento do risco de endometriose e de câncer de mama.

#### **3.1.6.1.2. Isoflavonas e osteoporose**

Osteoporose, que significa literalmente osso poroso, é uma doença resultante da perda gradual de massa óssea que ocorre naturalmente com o envelhecimento, o que provoca fragilidade dos ossos e aumenta o risco de fraturas, especialmente do quadril, coluna e punho (NHI, 2004). Uma combinação entre fatores genéticos, hormonais, etários e do estilo de vida contribuem para a susceptibilidade a essa doença (FDA, 1996).



A osteoporose é um problema de preocupação mundial, e atinge especialmente mulheres em idade pós-menopausa: estima-se que 1/3 das mulheres brancas com mais de 65 anos sofrem de osteoporose (WHO, 1994; citada por Osteoporose.med, 2004). A osteoporose também pode atingir homens: a chance de fratura osteoporótica para homens brancos acima de 65 anos é de 25% (NHI, 2004). Em 1990, foram reportados 1,66 milhão de casos de fratura de bacia no mundo todo, dois terços dos casos ocorridos com mulheres (Cooper et al., 1992, citados por Messina, 1999). Esse tipo de fratura pode levar a invalidez permanente, perda da independência e até mesmo a morte (FDA, 1996). Estatísticas recentes apontam que ocorrem 80.000 casos de fratura de bacia em homens americanos, dos quais um terço morre no primeiro ano após a fratura (NHI, 2004). Os EUA gastam aproximadamente 14 bilhões de dólares por ano no tratamento hospitalar e domiciliar de osteoporose e fraturas decorrentes da baixa densidade óssea (NHI, 2004).

Populações de países industrializados apresentam alta incidência de osteoporose, como por exemplo, nos Estados Unidos, cerca de 10 milhões de pessoas são acometidas por essa doença e 34 milhões apresentam baixa densidade óssea (NHI, 2004). No Brasil, não há estatísticas oficiais, mas a Sociedade Brasileira de Osteoporose (2004) apresentou as seguintes estimativas no Congresso Mundial de Osteoporose 2004: (i) no Brasil, uma em cada três pessoas que sofrem de osteoporose é diagnosticada corretamente; (ii) apenas um entre cada cinco diagnosticados recebem algum tipo de tratamento; (iii) cerca de 10 milhões de brasileiros sofrem de osteoporose, sendo que 2,4 milhões sofrerão algum tipo de fratura a cada ano e destes pacientes, 200.000 morrerão por complicações decorrentes da fratura.

A perda de massa óssea nas mulheres ocorre mais rapidamente nos dez primeiros anos após o fim dos ciclos menstruais ou da retirada cirúrgica dos ovários. A deficiência hormonal causa um desbalanceamento entre a reabsorção e formação óssea, acelerando a perda de massa óssea (Stepan et al., 1987; citados por Arjmandi & Smith, 2002). O tratamento mais adotado combina um agente antireabsorptivo e um agente que estimula a proliferação osteoblástica. Dentre os agentes reabsorptivos, a terapia de reposição hormonal convencional (TRH) é considerada o tratamento mais efetivo, e apresenta ação comprovada



na redução da taxa de perda de massa óssea e na redução de risco de fratura óssea, incluindo fratura de bacia (Genant, et al., 1989; WHO, 1994; citados por Arjmandi & Smith, 2002). Entretanto, a TRH apresenta alguns efeitos colaterais indesejáveis, como o aumento de risco de câncer de útero e de mama (Messina, 2000). Recentemente, o composto raloxifeno (Figura 9) mostrou ser efetivo tanto na redução de reabsorção de massa óssea quanto no aumento desta (Heaner & Draper, 1997; citados por Arjmandi & Smith, 2002). O raloxifeno é considerado um *SERM*, assim como as isoflavonas. De fato, a isoflavona daidzeína é um metabólito da ipriflavona (Figura 10), droga usada na Itália e Japão para inibir a reabsorção óssea (Valente et al., 1994, citados por Messina, 1999).

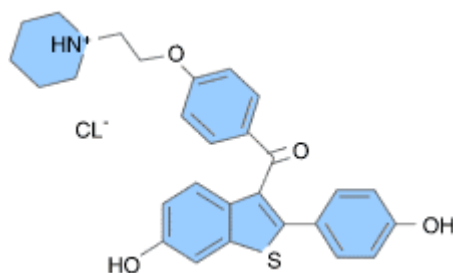


Figura 9: Estrutura química do raloxifeno (NCI, 2002).

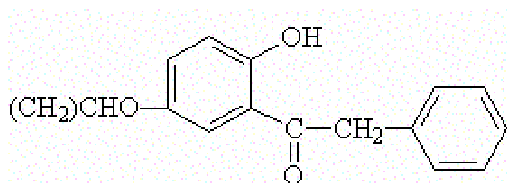


Figura 10: Estrutura química da ipriflavona (Messina, 1999).

Há controvérsia se os efeitos benéficos do consumo de soja à saúde óssea se devem somente as isoflavonas, ou à proteína de soja ou a combinação de ambas. A substituição de proteína animal por proteína de soja reduz substancialmente a excreção de cálcio, devido ao baixo conteúdo de aminoácidos sulfurados dessa proteína vegetal (Breslau et al., 1988, citados por Messina, 2000). Os aminoácidos sulfurados metionina e cisteína são metabolizados a sulfato e hidrogênio, resultando em cinzas ácidas, que lixiviam cálcio dos ossos, e conseqüentemente, aumentam a excreção de cálcio (Green & Kleeman, 1991;



citados por Messina, 1999). Cem gramas de grãos de soja *in natura* contêm em média, 230 mg de cálcio (EMBRAPA, 2004), o equivalente a 23% da ingestão diária para adultos recomendada pela FAO/WHO (2001, citados pela ANVISA, 2003) e, mesmo a soja contendo fitatos e oxalatos, que podem reduzir a absorção de cálcio, o cálcio presente na soja é tão bem absorvido quanto aquele presente no leite (Heaney et al., 1991; citados por Messina, 1999). Leites de soja fortificados com cálcio e tofus fabricados com cloreto de cálcio como agente coagulante são excelentes fontes de cálcio (Messina, 1999).

Estudos realizados com animais e humanos indicam que as isoflavonas podem estimular a formação óssea e inibir sua reabsorção. Anderson et al. (1987; citados por Messina, 1999) realizaram um estudo com ratas ovariectomizadas, cuja dieta restrita em cálcio foi suplementada com 1 mg/dia de genisteína. Houve aumento de massa óssea em relação ao grupo controle, mas em dosagens maiores de genisteína (3,2 e 10 mg/dia) não foi observado nenhum efeito.

Um estudo com ratas ovariectomizadas realizado por Fanti et al. (1996) sugeriu que a genisteína é capaz de aumentar a densidade óssea pelo estímulo à formação óssea, e não pela inibição da reabsorção. Jeffery (1999) realizou um estudo com ratas ovariectomizadas, dividindo-as em 3 grupos: controle, estudo 1 (que recebeu extratos semi-purificado de isoflavonas, o equivalente 0,08% da dieta em peso) e estudo 2 (que recebeu estrógeno). Ao fim de 2 meses de estudo, os animais do grupo estudo 1 apresentaram densidade óssea femoral próxima ao do grupo estudo 2, e ambos apresentaram densidades ósseas femoral e lombar maiores do que as do grupo controle.

Erdman et al. (1996), em estudo de 6 meses com mulheres em idade pós-menopausa, relataram que o consumo diário de 40 mg de proteína isolada de soja contendo 2,25 mg de isoflavonas/g de proteína aumentou significativamente a densidade mineral óssea da espinha lombar do grupo estudo em comparação ao grupo controle, que consumiu 40 g de caseína por dia. Galagher (1999), em estudo de 9 meses com mulheres em idade pós-menopausa, cuja dieta contendo proteína de soja foi suplementada com 96 ou 52 mg de isoflavonas por dia, não encontrou diferença nas densidades femorais ou lombares entre os

grupos estudo e controle, que não recebeu suplementação. Dois estudos recentes (Uesugi et al., 2002; Yamori et al., 2002) apontaram efeitos positivos da ingestão de isoflavonas purificadas na forma de cápsulas (dosagens de 61,8 mg/dia e 37,3 mg/dia, respectivamente) na redução da excreção via urina de marcadores de reabsorção óssea em mulheres em idade pós-menopausa.

Arjmandi & Smith (2002) sugerem dois mecanismos para a ação da soja ou suas isoflavonas sobre a saúde óssea: (i) as isoflavonas podem estimular a atividade osteoblástica pela ativação dos receptores de estrogênio do tipo  $\beta$ , localizados nos osteoblastos; (ii) a soja ou suas isoflavonas podem promover a produção de IGF-1 (insulin-like growth factor), que estimula a formação óssea.

### **3.1.6.2. Atividade anticarcinogênica**

A incidência de câncer de mama, cólon e de próstata em populações do sudeste asiático é muito menor do que a observada nas populações do norte da América e oeste Europeu (Barnes, 1995). Estudos epidemiológicos indicam que a diferença entre as dietas dessas populações pode ser um fator importante na redução do risco de câncer (Messina & Barnes, 1991), e que a soja poderia apresentar papel protetor contra o câncer, uma vez que soja e alimentos derivados são a base da alimentação tradicional das populações orientais (Messina et al., 1994). Wu et al. (1998) revisaram alguns estudos epidemiológicos sobre incidência de câncer de mama em países asiáticos e em imigrantes de origem oriental vivendo no Ocidente (Estados Unidos e Canadá). Historicamente, a incidência de câncer de mama em mulheres ocidentais nos EUA e Europa é 6 vezes maior que a incidência observada em mulheres japonesas e chinesas, mas quando ocorre a imigração e adaptação à dieta do ocidente, as filhas de orientais passam a correr o mesmo risco de desenvolver câncer de mama que as mulheres ocidentais vivendo na mesma região. A evidência do impacto da dieta sobre a incidência de câncer de mama têm sido observada também nas áreas urbanas do Japão, China e Singapura, cujas taxas de incidência de câncer de mama têm aumentado nas últimas quatro décadas, concomitantemente à mudança da dieta, que

têm se aproximado da dieta ocidental em percentual de calorias oriundas de gordura (Kelsey et al., 1993; Ursin et al., 1994; Kato et al., 1987; Kodama et al., 1991; citados por Wu et al., 1998).

Durante a década de 80, diversos pesquisadores investigaram o efeito da soja na dieta contra o câncer em estudos com animais (Quadro 3). Embora a maioria dos estudos não tenha sido feita com foco em isoflavonas, observa-se de um modo geral o efeito protetor da soja contra vários tipos de câncer em animais.

Quadro 3: Efeitos da soja e seus produtos em estudos sobre câncer induzido em animais.

Tipo de câncer	Agente indutor	Animal	Produtos de soja	Resultados	Autores
Mama	DMBA	Ratos	<i>Genisteína</i> Isolado protéico Isolado protéico Isolado protéico <i>Missô</i>	<i>Efeito protetor</i> Sem efeito Sem efeito Efeito protetor Efeito protetor	<i>Sharma et al. (1992)</i> Caroll (1975) Hsuch (1990) Barnes et al. (1990) Baggot et al. (1990)
	NMU	Ratos	Isolado protéico Isolado protéico	Efeito protetor Efeito protetor	Barnes et al. (1990) Hawrylewicz et al. (1991)
	Raios X	Ratos	Grãos de soja Grãos de soja	Efeito protetor Efeito protetor	Barnes et al. (1990) Trol et al. (1980)
Fígado	AAF	Ratos	Isolado protéico	Sem efeito	Rogers et al. (1980)
	Aflatoxina	Ratos	Isolado protéico	Efeito protetor	Young (não publicado)
	DES+PHB	Ratos	Isoflavonas	Sem efeito	Hendrich & Lee (1993)
	Nitrito+DBA	Camundongos	Grãos de soja	Efeito protetor	Mokhttar et al. (1988) Fitzsimmons et al. (1989)
	Espontâneo	Camundongos	Isolado protéico <i>Missô</i>	Efeito protetor Efeito protetor	Becker (1981) Ito et al. (1993)
Cólon	DMH	Ratos	Isolado protéico Isolado protéico <i>Genisteína</i>	Sem efeito Sem efeito <i>Efeito protetor</i>	Reddy et al. (1976) Clinton et al. (1979) <i>Helms &amp; Gallagher (1995)</i>
	AOM	Ratos	<i>Genisteína</i>	<i>Efeito protetor</i>	<i>Steele (não publicado)</i>
Próstata	Espontâneo	Ratos	Soja	Efeito protetor	Sharma et al. (1992)
	DES	Ratos	Soja	Efeito protetor	Makela et al. (1991)
	MNU/TP	Ratos	Grãos de soja	Efeito protetor	Pollar, não publicado.

DMBA: 7,12-dimetilbenzantraceno; NMU: N-metil-N-nitrosouréia; AAF: N-2-fluorenulacetamida; DES: dietilstilbestrol; PHB: fenobarbital; DBA: N-dibutilamina; DMH: 1,2-dimetilhidrazina; AOM: azoximetano; TP: testosterona propionato.

Fonte: Barnes (1995).



A importância da soja como agente protetor contra o câncer atingiu expressão, principalmente, devido aos estudos de Akiyama et al. (1987), que identificaram que a principal isoflavona da soja, a genisteína, é um potente inibidor específico da tirosina quinase, enzima envolvida na proliferação de células cancerosas. Diversos pesquisadores identificaram que a genisteína seria capaz de inibir outras enzimas envolvidas no controle do crescimento e diferenciação celulares: MAP quinase, S6-quinase ribossômica e DNA topoisomerase II (Thorburn & Thorburn, 1994; Linassier et al., 1990; Markowits et al., 1989, Constantinou et al., 1990; citados por Messina, 1999). Barnes et al. (1994, citado por Barnes, 1995) sugerem entretanto, que a genisteína poderia prolongar o período de latência do câncer, ao invés de prevenir sua formação. A genisteína, *in vitro*, pode inibir o crescimento de células cancerosas com um IC<sub>50</sub> variando entre 5 a 100 µM/L (2-25 µg/mL – Tabela 2). Kim et al. (1998) e Cline (1999) propõem que a genisteína pode reduzir a incidência de vários tipos de câncer por diferentes mecanismos: antagonismo ao estrogênio, inibição da tirosina quinase, atividade antioxidante, inibição da angiogênese, inibição de proteases ou alteração do metabolismo de esteróides.

Em relação ao câncer de mama, Cassidy et al. (1994) observaram que o consumo diário de 60 g de proteína texturizada de soja (correspondente a 45 mg de isoflavonas) prolongou o ciclo menstrual do grupo estudado em 2,5 dias, enquanto que não foram observadas alterações no grupo controle, que recebeu proteína texturizada sem isoflavonas. A literatura científica indica que ciclos menstruais mais longos, típicos das mulheres asiáticas, estão associados a menor risco de desenvolvimento de câncer de mama (Olsson et al., 1983; Yuan et al., 1988; citados por Messina, 1999).

Tabela 2: Inibição do crescimento de células cancerosas *in vitro* pela genisteína.

<i>Linhagem da célula cancerosa humana</i>	<i>Estímulo</i>	<i>IC<sub>50</sub> (μmol/L)</i>	<i>Referência</i>
Mama MCF-7, MDA-468 e T47D	Soro	22-37	Peterson & Barnes (1991)
Próstata LNCaP e DU-145	Soro	82-137	Peterson & Barnes (1993)
Gástrica HGC-27	Soro	20	Matsukawa et al. (1993)
Neroblastoma WAC2	Soro	~20	Schweiger et al. (1992)
Leucemia mioblástica MLI	Soro	10	Makimishima et al. (1991)
Leucemia monoblástica U937		8,1	
Células endoteliais	bFGF	~3,7 - 18	Fotsis et al. (1993)
Leucemia mielogenosa K-562	Soro	9,3	Homma et al. (1991)
Linfócitos T periferais	PMA/anti CD-28	<18	Alturu & Alturu (1991)
Linfócitos T periferais	PHA	< 100	Mustelin et al. (1990)

bFGF: fator de crescimento do fibroblasto; PMA: forbol miristol acetato

Fonte: Barnes et al. (1995)

As concentrações nas quais a genisteína é capaz de inibir o crescimento de células cancerosas *in vitro* (5 - 40 μM) são muito maiores do que o pico de concentração de genisteína no plasma de pessoas que consomem grandes quantidades de soja e derivados (1 - 6 μM). Este fato sugere que a concentração celular de genisteína para inibição de células cancerosas seria muito menor *in vivo* do que *in vitro*, já que a maior parte da genisteína presente no sangue está ligada a SHBG (*sex hormon binding globulin*) ou na forma de glucuronídeo (Barnes, 1995; Messina, 1999). Dada a farmacocinética das isoflavonas (não ocorre acúmulo nos tecidos e os metabólitos são eliminados via urina), os estudos com modelos animais sugerem que as isoflavonas sejam ministradas ao longo do dia ao invés de uma única dose (Barnes, 1995; Messina, 1999).

Apesar da baixa concentração de genisteína no plasma, há outras razões pelas quais o consumo de soja poderia exercer efeito protetor contra o câncer:

- Embora a genisteína possa estar ligada à SHBG no soro, alguns trabalhos indicam que pode ocorrer a dissociação dos hormônios ligados à SHBG nos capilares, de modo que a fração que de fato atua sobre as células alvo é maior do que a fração livre medida em condições de equilíbrio (Farnsworth, 1996, citado por Messina, 1999).
- As células cancerosas podem concentrar genisteína, de modo que as concentrações no plasma e soro subestimam as concentrações intracelulares (Peterson et al., 1995, citados por Messina, 1999).
- Pode haver efeitos sinérgicos ou aditivos entre genisteína e daidzeína (cujo efeito contra o câncer têm sido pouco estudado) (Evans et al. 1995; citados por Messina, 1999).
- Outros compostos presentes na soja, como as saponinas, inibidores de protease, ácido fítico e fitosteróis também podem exercer efeitos contra o câncer (Messina & Barnes, 1991, citados por Barnes, 1995).

Messina et al. (1994), em revisão sobre a relação entre consumo de soja e o risco de câncer, incluindo estudos *in vitro*, com animais e epidemiológicos, concluíram que em 17 dos 26 estudos com animais, houve efeito protetor contra diversos tipos de câncer. Em relação aos estudos epidemiológicos, cerca de 20 trabalhos realizados na Ásia apontaram que o consumo de uma porção de produto de soja (na maioria dos casos, tofu) estava associado à redução do risco de câncer hormônio-dependentes e hormônio-independentes, incluindo pulmão, cólon, reto, mama, estômago e próstata. Mais estudos epidemiológicos e de intervenção precisam ser realizados para comprovar os efeitos do consumo de soja na prevenção do câncer. Caso os efeitos sejam comprovados, a incorporação de pequenas quantidades de alimentos à base de soja na dieta poderia exercer imenso impacto na saúde pública em diversos países ocidentais (Messina, 1999).

### **3.1.6.3. Atividade hipocolesterolêmica**

Os efeitos de dietas à base de proteína de soja nas concentrações de colesterol sanguíneo de coelhos foram reportados, pela primeira vez, em 1940 por Meeker & Kesten (citados por Lichtenstein, 1998). O primeiro estudo com humanos demonstrando os efeitos hipocolesterolêmicos da proteína de soja foi publicado em 1967 (Hodges et al., 1967; citados por Messina, 1999). Desde essa data, mais de 40 estudos clínicos sobre o tema foram conduzidos. Baseado em uma revisão de 26 estudos, Carrol (1991) concluiu que a substituição de proteína animal por proteína de soja num total de 13-20% da ingestão calórica total por 3-6 semanas reduziu a concentração de colesterol total em aproximadamente 20% em homens e mulheres com hipercolesterolemia. Não foram observadas reduções no HDL, mas foi constatada tendência de queda nas concentrações de triglicérides. Anderson et al. (1995) realizaram uma meta-análise de 38 estudos que utilizaram isolado protéico ou proteína texturizada (ou combinação de ambos) como fonte de proteína de soja. O consumo médio de proteína de soja nesses estudos foi de 47 g/dia (variando de 17–124 g/dia), embora em 14 estudos a ingestão diária fosse de 31 g/dia ou menos. Através dessa meta-análise, Anderson et al. (1995) chegaram às seguintes observações: (1) queda nos níveis de colesterol total em 34 de 38 estudos; (2) decréscimo médio no LDL de 12,9%; (3) decréscimo médio de triglicérides de 10,5%; (4) da mesma forma que verificado por Carrol (1991), no geral não foram observadas alterações nas concentrações de HDL, e as reduções nas concentrações de colesterol total e LDL foram mais acentuadas em pessoas com hipercolesterolemia acentuada (redução de 20%). A redução observada em indivíduos com colesterolemia normal e leve hipercolesterolemia foi de 3 e 4%, respectivamente.

Embora seja comumente aceito que para cada 1% de decréscimo na concentração de colesterol total o risco de doença cardíaca caia em 2%, uma análise recente feita por Law et al. (1999, citados por Messina, 1999) indica que esse valor está subestimado, e que a redução total do risco pode atingir 3 a 4%. Dessa forma, uma alteração na dieta pela substituição parcial de proteína animal por proteína de soja exerceria grandes impactos na saúde pública. Alguns países já reconhecem esse potencial, e estão recomendando o

consumo de proteína de soja. Na Itália, por exemplo, o Serviço de Nacional de Saúde fornece proteína de soja gratuitamente aos médicos para o tratamento de hipercolesterolemia (Sirtori et al, 1993; citados por Messina, 1999). Já nos Estados Unidos, o FDA aprovou em outubro de 1999 o seguinte *health claim*: “25 g de proteína de soja por dia, como parte de uma dieta pobre em gorduras saturadas e colesterol, pode reduzir o risco de doenças cardíacas”.

Os mecanismos de ação da proteína de soja sobre os lipídios de soro ainda não foram totalmente esclarecidos. Alguns mecanismos propostos incluem a alteração dos níveis hormonais, como uma redução da proporção insulina:glucagon, aumento dos níveis de tiroxina (Potter, 1995; citado por Messina, 1999) ou a relação lisina/arginina da proteína de soja (Kritchevsky, 1999). Anderson et al. (1995) sugerem que as isoflavonas seriam responsáveis por 60 a 70% dos efeitos da proteína de soja sobre o colesterol sanguíneo. Essa evidência é sustentada por estudos de intervenção realizados com coelhos e macacos. Huff et al. (1977; citados por Messina, 1999) observaram efeitos hipocolesterolêmicos em coelhos alimentados com proteína de soja, mas não no grupo controle alimentado com dieta de aminoácidos com perfil idêntico ao da caseína, nem no grupo de estudo alimentado com mistura de aminoácidos idêntica ao da proteína de soja, indicando que frações não-protéicas ou a interação destas com a proteína contribuem na redução do colesterol. Anthony et al. (1997) observaram drástica redução no colesterol total de macacos *rhesus* alimentados com proteína de soja rica em isoflavonas e pequena redução para os animais alimentados com proteína de soja cujas isoflavonas haviam sido removidas (em comparação aos animais alimentados com dieta controle de caseína). Em estudo semelhante, também realizado com macacos *rhesus*, St Clair (1998) observou, além da redução de colesterol total e LDL, aumento no HDL dos animais alimentados por 14 meses com proteína de soja rica em isoflavonas. Além disso, após autópsia, esses animais apresentaram maior elasticidade arterial e metade do percentual de placas de ateroma que o grupo controle (alimentado com caseína), bem como 90% de redução da área das placas de ateroma se comparado ao grupo controle e redução de 50% da área das placas se comparado ao grupo alimentado com proteína de soja sem isoflavonas.

Os efeitos hipocolesterolêmicos das isoflavonas poderiam ser atribuídos à sua atividade estrogênica, que permite sua ligação aos receptores de estrógeno. Em mulheres em idade pós-menopausa, devido à queda do nível de estrogênio, há uma tendência de aumento das concentrações de LDL colesterol e redução de HDL colesterol, elevando o risco de doenças cardíacas nessa faixa etária (Kerchkoffs et al., 2002). Por essa razão, vários estudos de intervenção com isoflavonas têm, como grupo-alvo de estudo, mulheres em idade pós-menopausa.

Kerchkoffs et al. (2002) revisaram recentemente diversos estudos sobre o efeito de isoflavonas nas concentrações de colesterol no sangue de humanos. Na maioria dos casos, observou-se redução do colesterol total, mas sem alteração nas concentrações de triglicérides, e o efeito, quando observado, estava relacionado à dose de isoflavonas ministrada (Quadro 4).

O Quadro 4 mostra que os estudos realizados com isoflavonas purificadas não apresentaram efeitos sobre a colesterolemia, enquanto que na maioria dos estudos em que as isoflavonas estavam associadas à proteína intacta, efeitos positivos foram observados, o que sugere um sinergismo entre isoflavonas e proteína de soja (Potter, 1998). A administração de isoflavonas purificadas à dieta pode, entretanto, reduzir o número e área de lesões ateroscleróticas como observado no estudo com coelhos de Yamakoshi et al. (2000), além de reduzir a oxidação de LDL colesterol, ainda que não sejam observadas alterações nas concentrações dos lipídios de soro.

Quadro 4: Efeitos do consumo de produtos de soja e isoflavonas sobre os lipídios do sangue.						
Grupo estudado	Alimento de soja	Duração do estudo	Forma de inclusão na dieta	Ingestão de isoflavonas (mg/dia)	Efeitos observados	Fonte
Mulheres em idade pré-menopausa	Proteína texturizada	1 mês	60 g/dia em salsichas, hambúrgueres, cozidos vegetarianos	23 45	Sem efeitos ↓ 9% colesterol total	Cassidy et al. (1995)
Mulheres hipercolesterolêmicas em idade pós-menopausa	Isolado protéico	6 meses	40 g/dia em pães, bolos, bebidas, sopas	56 ou 95	↓ colesterol total, LDL e VLDL ↑ HDL ↑ receptores LDL do fígado	Potter et al. (1995)
Mulheres normocolesterolêmicas em idade peri-menopausa	Proteína em pó	6 semanas	20 g/dia em leite, bebidas, iogurte e cereais	34	↓ 7% LDL	Washburn et al. (1999)
Homens e mulheres moderadamente hipercolesterolêmicos	Isolado protéico	9 semanas	25 g/dia em bebida de soja	3 ou 27 37 62	Sem efeitos ↓ 8% LDL ↓ 6% LDL	Crouse et al. (1999)
Homens moderadamente hipercolesterolêmicos	Isolado protéico	6 semanas	20, 30, 40 ou 50 g/dia em produtos de panificação e bebidas	38 57 76 95	↓ 2% LDL e 3% VLDL ↓ 3% (LDL + VLDL) ↓ 2% (LDL + VLDL) ↓ 5% (LDL + VLDL)	Teixeira et al., (2000)

Quadro 4. Efeitos do consumo de produtos de soja e isoflavonas sobre os lipídios do sangue (continuação)						
Grupo estudado	Alimento de soja	Duração do estudo	Forma de inclusão na dieta	Ingestão de isoflavonas (mg/dia)	Efeitos observados	Fonte
Mulheres japonesas normolipidêmicas em idade pré-menopausa	Leite de soja	2 meses	350 mL/dia de leite de soja, contendo 15 g de proteína	96	↓ 5% colesterol total	Takatsuka et al. (2000)
Mulheres moderadamente hipercolesterolêmicas em idade pós-menopausa	Bebida à base de isolado protéico	93 dias	85 g/dia em bebida de soja	65 132	Sem efeito ↓ 7% LDL	Wangen et al. (2001)
Homens normocolesterolêmicos	Suplemento de isolado protéico	28 dias	60 g suplemento	131	Sem efeito	Gooderham et al. (1996)
Mulheres em idade peri e pós-menopausa	Isoflavonas purificadas	5-10 semanas	Tabletes (dose única)	80	Sem alteração colesterol ↑ elasticidade arterial	Nestel et al. (1997)
Homens e mulheres (idade pós-menopausa) hiperlipidêmicos	Proteína de soja	3 semanas	Cereais matinais	168 mg	Sem efeito	Jenkins et al. (2000)
Mulheres em idade pós-menopausa normocolesterolêmicas	Isoflavonas purificadas	8 semanas	Tabletes (dose única)	80	Sem efeito	Simons et al. (2000)
Mulheres em idade pós-menopausa	Isoflavonas purificadas	6 meses	Tabletes	150	Sem efeito	Hsu et al. (2001)

Compilado de Kerchkoffs et al. (2002).



Os prováveis mecanismos de atuação das isoflavonas sobre o colesterol sanguíneo e seus efeitos protetores ao sistema cardiovascular seriam:

- Aumento da atividade dos receptores de LDL no fígado, favorecendo a síntese e excreção de ácidos biliares e, portanto, do colesterol (Sirtori et al., 1984; citados por Anthony et al., 1997);
- Aumento da elasticidade arterial, que melhora a circulação sanguínea (Nestel et al., 1997; Honore et al., 1997; citados por Lichtenstein, 1998).
- Atividade antioxidante das isoflavonas: como os demais compostos polifenólicos, as isoflavonas apresentam atividade antioxidante (Accame, 2001). Altas concentrações de antioxidantes na corrente sanguínea estão associadas à diminuição do risco de doenças cardiovasculares (Setchell & Cassidy, 1999). As agliconas genisteína e daidzeína podem atuar como sequestradores de radicais livres (Ruiz-Larrea et al., 1997; citados por Yamakoshi et al., 2000). Genisteína apresenta alta atividade antioxidante em culturas de células (Naim et al., 1976; Wei et al., 1993; citados por Anthony et al., 1997). A atividade antioxidante das isoflavonas foi observada tanto em fases aquosas quanto lipofílicas (Ruiz-Larrea et al., 1997; Arora et al., 1998; citados por Yamakoshi et al., 2000). O LDL oxidado apresenta potencial aterogênico maior do que o do LDL nativo (Esterbauer et al., 1997; citados por Lichtenstein, 1998). As isoflavonas podem inibir *in vitro* a oxidação de LDL pelos macrófagos (Kapiotis et al., 1997; citados por Lichtenstein, 1998), aumentar a resistência do LDL à oxidação *in vitro* (de Whalley et al., 1990; Kanazawa, et al., 1995; citados por Lichtenstein, 1998) e inibir a oxidação de lipoproteínas do soro (Hodgson et al., 1996; citados por Yamakoshi et al., 2000). Além disso, os metabólitos de daidzeína, O-desmetilangosina e equol mostraram-se inibidores mais potentes da oxidação de lipoproteínas de soro que daidzeína e genisteína (Hodgson et al., 1996; citados por Yamakoshi et al., 2000). Kapiotis (1997; citado por Lichtenstein, 1998), reportou que a genisteína pode inibir, *in vitro*, a oxidação de LDL colesterol catalisada por cobre e por radicais superóxido/óxido nítrico, além de proteger células endoteliais de aorta humana contra danos causados pelo LDL oxidado.

- As isoflavonas podem reduzir a velocidade de formação de placas ateroscleróticas pela inibição da adesão celular e pela alteração da atividade de fatores de crescimento específicos e citoquinas, que atuam na formação de lesões (Raines et al., 1995; citados por Setchell & Cassidy, 1999).

A revisão da literatura mostra que as isoflavonas podem atuar de diversos modos na redução do risco de doenças cardiovasculares, ao contrário dos medicamentos, que basicamente atuam na redução do colesterol (Setchell & Cassidy, 1999). Mais estudos são ainda necessários para confirmar a relação dose/resposta e os mecanismos de ação das isoflavonas, o que aumentariam as evidências científicas para recomendar o consumo de alimentos de soja ricos em isoflavonas em substituição aos medicamentos convencionais (Kerchkoffs et al., 2002).

### **3.1.7. Ingestão diária recomendada de isoflavonas**

Estimativas recentes feitas com base na dieta tradicional de populações asiáticas, rica em alimentos à base de soja, sugerem que o consumo médio de isoflavonas por essas populações varia entre 11 a 45 mg de agliconas/dia, enquanto que a média observada nos países ocidentais é menor que 2 mg de isoflavonas/dia (Munro et al., 2003). Com base em estudos epidemiológicos, alguns autores recomendam o consumo de cerca de 15 g de proteína de soja/dia e 50 mg de agliconas/dia (Setchell et al., 2001; Messina, 2004 b), quantidade que pode ser encontrada em cerca de 2 porções de alimentos tradicionais de soja (Messina, 2004 b).

A Tabela 3 mostra dados estimativos da quantidade de isoflavonas presentes por porção de alguns alimentos de soja. Como as concentrações de isoflavonas nos alimentos processados dependem do cultivar, safra, local e clima de plantio do grão, além das condições de processamento, os dados podem sofrer variações, servindo porém como orientação em relação ao número de porções a serem consumidas. Nos EUA, por exemplo, a ingestão de 50 mg/dia de agliconas poderia ser alcançada com o consumo diário de uma

ou duas porções de leite de soja e uma de tofu, ou de apenas uma porção de soja torrada (*soy nut*), consumida normalmente como *snack*. Dados obtidos por Genovese e Lajolo (2002) indicam que com o consumo diário de uma porção de proteína texturizada de soja e de duas porções de leite de soja UHT (sabor natural) também seriam suficientes para atingir a ingestão de 50 mg isoflavonas agliconas/dia. As bebidas à base de soja elaboradas com sucos de frutas, que se tornaram muito populares no Brasil nos últimos anos, contêm apenas cerca de 22% a 39% da quantidade de isoflavonas que a versão sabor natural, não adicionada de sucos.

Tabela 3: Concentração estimada de isoflavonas (expressas como agliconas) em porções de alimentos de soja (mg/porção).

<i>Alimento</i>	<i>Concentração total de isoflavonas<sup>a</sup> (µg/g b.u. ou µg/mL)</i>	<i>Fonte</i>	<i>Tamanho da porção (g)</i>	<i>Quantidade de isoflavonas agliconas (mg/porção)</i>
Soja torrada (EUA)	2.661	Wang & Murphy, (1994 a)	20	53,2
Tofu (EUA)	202 – 512	USDA (1999)	100	20,2 – 51,2
Tofu (Brasil)	68	Genovese & Lajolo (2002)	100	6,8
Leite de soja UHT (EUA)	96 - 165	Murphy et al. (1999)	200	19,2 – 33,0
Leite de soja pasteurizado (EUA)	80 - 97	Murphy et al. (1999)	200	16,0 – 19,4
Leite de soja UHT sabor natural (Brasil)	82,9	Genovese & Lajolo (2002)	200	16,6
Bebidas com soja saborizadas com suco de frutas	17,8 - 32,6	Genovese & Lajolo (2002)	200	3,6 – 6,5
Proteína texturizada de soja (EUA)	44 – 2.956	USDA (1999)	30	1,3 – 88,7
Proteína texturizada de soja (Brasil)	869 - 999	Genovese & Lajolo (2002)	30	26,0 – 30,0

<sup>a</sup> expressa em agliconas

Os tamanhos de porção foram definidos com base na Tabela de Valores de Referência para Porções de Alimentos e Bebidas Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional anexa a RDC nº 39 da ANVISA (2001).

Dada a farmacocinética das isoflavonas (meia vida no plasma inferior a 12 h), a manutenção de uma concentração regular no plasma ao longo do dia potencializaria os seus efeitos fisiológicos (Setchell, 2000). Uma concentração regular pode ser obtida pela ingestão de isoflavonas em várias doses ao dia, como por exemplo, nos horários das refeições.

### **3.2. Isolado protéico de soja (IPS)**

#### **3.2.1 Definição, histórico e utilização**

A AAFCO (*Association of American Feed Control Officials, Inc*) define IPS como “a maior fração protéica da soja, obtida a partir de grãos de soja descascados pela remoção dos constituintes não-protéicos, e que deve conter pelo menos 90% de proteína (% N x 6,25) em base seca” (’90 Soya Bluebook, citado por Berk, 1992).

O IPS já era produzido em escala industrial no início dos anos 30, para uso como adesivo na indústria de papel (Circle & Smith, 1972). O primeiro IPS de grau alimentício foi produzido em 1960 pela Central Soya Company, e foi obtido pela extração de proteínas com solução fracamente alcalina para remoção de carboidratos insolúveis, seguida de precipitação com ácido para remoção dos carboidratos solúveis. Desde então, houve um aumento crescente na produção de IPSs para consumo humano, os quais tem encontrado aplicação nas indústrias cárnea, láctea, de panificação, de confeitaria e de bebidas, entre outras (Hettiarachchy & Lalapathy, 1999).

A legislação brasileira (Resolução CNNPA nº 14 , de 28 de junho de 1978) estabelece o seguinte padrão de identidade e qualidade para IPS (Tabela 4) :

Tabela 4: Padrão brasileiro de identidade e qualidade para IPS.

Apresentação	Pó fino, de cor, odor e sabor próprios
<b>Características físico-químicas</b>	
Proteínas (% N x 6,25) (% mín. em base seca)	88
Fibra bruta (% máx.)	1
Umidade (% máx.)	6
Gordura (% máx.)	0,5
Cinzas (% máx.)	6
Índice de proteína dispersível (IDP) (% mín.)*	6
Fragmentos de insetos (em 100 g)	Ausente
<b>Características microbiológicas</b>	
Contagem total de mesófilos (UFC/g máx.)	$5,0 \times 10^4$
Coliformes totais (em 1 g)	Ausente
Bolores e leveduras (UFC/g máx.)	$1,0 \times 10^3$
<i>Salmonella spp</i> (em 50 g)	Ausente

Fonte: CNPPA, 1978.

\* Índice de proteína dispersível: a solubilidade das proteínas de produtos derivados de soja é um número que indica quantos gramas a cada 100 g de proteína são solúveis ou dispersíveis em água, em condições padrão (Zangelmi et al., 1982).

Os IPSs são usados em diversos sistemas alimentícios devidos às suas propriedades funcionais tecnológicas tais como solubilidade, absorção e retenção de água, viscosidade, gelificação, elasticidade, emulsificação, absorção de gordura e formação de espuma (Kinsella, 1979; citado por Hettiarachchy & Kalapathy, 1999). Essas propriedades são influenciadas pelo tipo de processamento adotado (Berk, 1992).

### 3.2.2. Processo de produção de IPS

O processo convencional de IPS consiste na solubilização das proteínas a pH neutro ou levemente alcalino, seguida de centrifugação para separação dos sólidos insolúveis (fibras e polissacarídeos), e precipitação por acidificação até a faixa de pH isoeletrico, ao redor de 4,5 (variações entre 4,1 a 4,6 podem ser aplicadas). O IPS é recuperado por

centrifugação, que o separa dos constituintes solúveis (açúcares, tais como: sacarose, estaquiose, rafinose; proteínas não precipitadas; nitrogênio solúvel e sais) (Zangelmi et al., 1982). O produto resultante é denominado isolado protéico isoelétrico, cuja solubilidade em água e propriedades funcionais são limitadas. Proteinatos podem ser produzidos pela ressuspensão do IPS isoelétrico em água, neutralização com bases e secagem em *spray-dryer*. Hidróxidos de sódio, potássio, amônio ou cálcio podem ser utilizados. Os três primeiros geram proteinatos altamente solúveis em água, produzindo soluções com boas capacidades de formação de gel, emulsificação e formação de espuma, além de alta viscosidade, enquanto os proteinatos de cálcio apresentam baixa solubilidade, sendo usados principalmente para aumento do teor protéico de formulações (Berk, 1992). O máximo de rendimento de proteína é obtido com extração a pH 9,0 (Berk, 1979; 1992).

O IPS obtido pelo processo convencional consiste de uma mistura de globulinas e glutelinas. Processamentos em escala laboratorial podem recuperar até 84% do total de proteína presente na matéria-prima, que contém geralmente 50% de proteína, o que resulta num rendimento em peso de 42%. Em escala industrial, porém, o rendimento pode cair para 30%, devido às perdas de processo (Berk, 1972). O processamento de IPSs em escala industrial pode ser resumido no fluxograma a seguir (Figura 11):

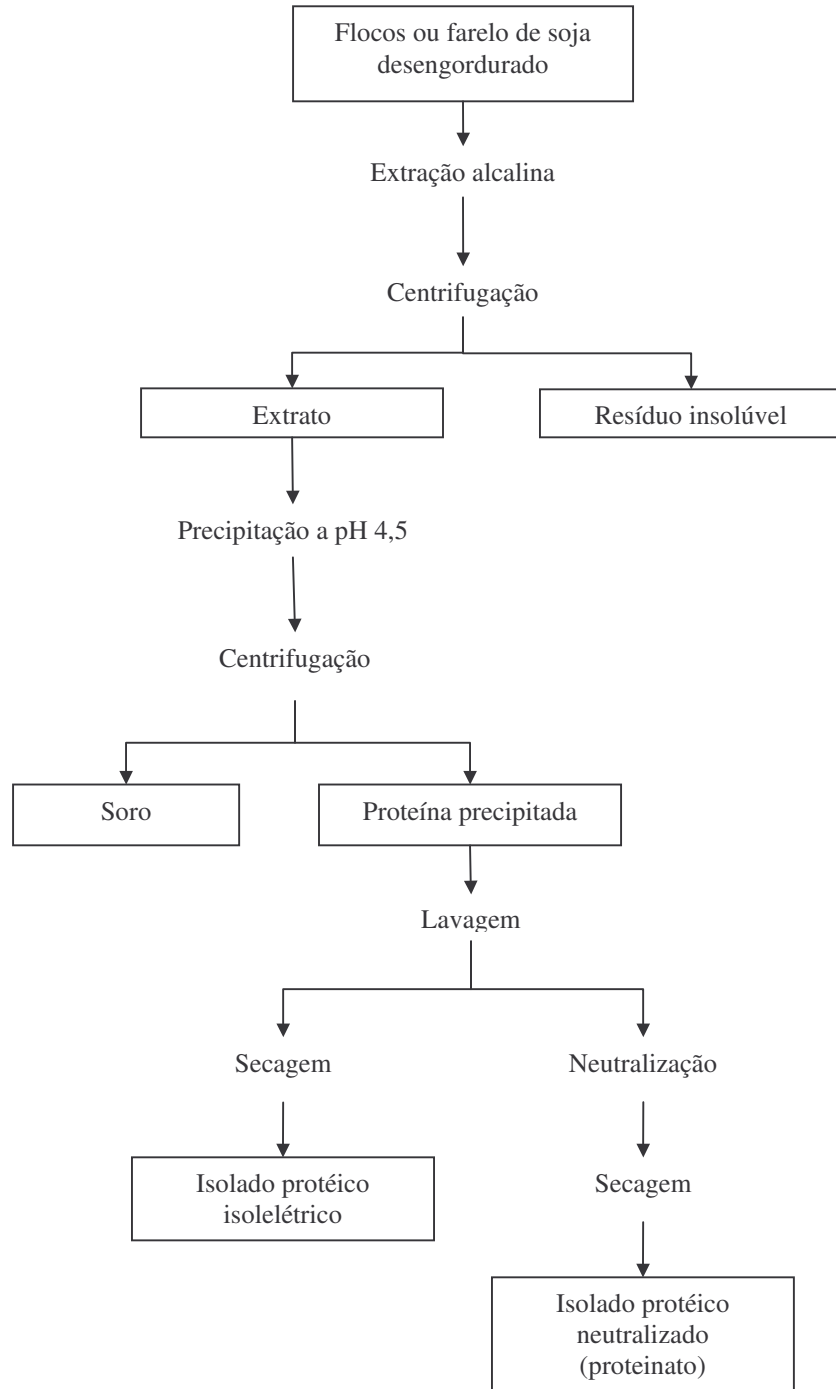


Figura 11: Fluxograma de produção de IPs em escala industrial (Hettiarachchy & Kalapathy, 1999).





### **3.2.3. Rendimento e qualidade do IPS**

O rendimento do processo de fabricação industrial de IPS varia de 30 a 40% do peso da matéria-prima inicial. O IPS contém cerca de 75% da proteína inicial presente nos flocos/farelo de soja. Aproximadamente 3 toneladas de flocos/farelo de soja são necessárias para produzir 1 tonelada de IPS. O rendimento relativamente baixo explica, em grande parte, o alto custo do IPS (Berk, 1992). O rendimento varia de acordo com o conteúdo protéico da matéria-prima, condições de extração e quantidades de compostos não protéicos precipitados como impurezas: lipídios, ácido fítico, saponinas e carboidratos (Circle & Smith, 1972).

O IPS é um produto de coloração creme claro e o seu sabor é considerado suave quando comparado à FSD, à proteína texturizada ou mesmo ao CPS (Berk, 1979). O IPS obtido por processo convencional contém algumas impurezas, como fitatos e fenólicos que podem conferir sabores estranhos ao produto. Tratamento do extrato antes da precipitação pode remover essas impurezas, melhorando as características organolépticas e modificando as propriedades funcionais tecnológicas: (i) troca iônica pode remover os fitatos e reduzir o teor de cinzas; (ii) tratamento com carbono ativo pode remover os fenólicos; (iii) ultrafiltração para concentração e remoção de componentes de baixo peso molecular. Embora esses processos estejam relatados na literatura, é pouco provável que esteja sendo aplicados em escala industrial (Berk, 1992).

### **3.2.4. Resíduos de processo e sua utilização**

- Resíduo insolúvel da extração (*okara*): sólidos insolúveis resultantes da extração de proteínas a pH alcalino, representam cerca de um terço do peso da matéria-prima inicial (Berk, 1992). Contém aproximadamente 40% dos sólidos e 15% da proteína presentes na matéria-prima. Usualmente, é prensado, seco e vendido como subproduto do processo de IPS, podendo ser usado como fonte de proteína para ração animal ou, mais recentemente, como fonte de fibra dietética para nutrição

humana. Pode ser utilizado como ingrediente na indústria alimentícia devido a sua excepcional capacidade de absorção de água (Berk, 1992).

- Soro: é o líquido sobrenadante resultante da etapa de precipitação. Contém açúcares e outras substâncias não precipitáveis por acidificação (Circle & Smith, 1972). Aproximadamente 25% da matéria seca e 10% do conteúdo de nitrogênio da matéria-prima são encontrados nesta fração. Hackler et al. (1963, citados por Berk, 1992) indicaram que o soro poderia ser tóxico para animais, o que explica o fato de não ser destinado à ração animal. Parte das proteínas poderia ser recuperada pela coagulação por calor (Van Etten et al., 1959; citados por Circle & Smith, 1972) ou por tratamento com gomas ou detergentes comestíveis (Elridge et al., 1962; Smith et al., 1962; citados por Circle & Smith, 1972). Entretanto, o soro é uma solução muito diluída, apresentando somente de 1 a 3 % de sólidos, dependendo da razão meio de extração/matéria-prima. Concentração e secagem do soro são processos de alto custo, o que torna o soro um descarte de processo (Berk, 1992). Se as questões econômicas e de toxicidade fossem resolvidas, o soro poderia ser utilizado na nutrição animal e humana, ou como fonte para fracionamento de proteínas (Circle & Smith, 1972). O alto conteúdo de carboidratos fermentáveis poderia ainda torná-lo um possível ingrediente de processos fermentativos (Kawamura, 1955; citado por Circle & Smith, 1972).

### **3.2.5. Processos não-convencionais de produção de IPS**

Processos não convencionais de produção de IPS foram desenvolvidos em escalas experimentais, com poucas aplicações comerciais, tais como: (i) separação por ultracentrifugação (Wolf et al., 19962; citados por Hettiarachchy & Kalapathy, 1999); (ii) processamento por membranas: ultrafiltração e diafiltração, ou ultrafiltração e osmose reversa (Hensley & Lawhon, 1979; Lawhon et al., 1977; citados por Hettiarachchy & Kalapathy, 1999); (iii) extração com sal e recuperação por ultrafiltração (Murray et al., 1980; citados por Hettiarachchy & Kalapathy, 1999); (iv) separação dos corpos protéicos

dos cotilédones por moagem e (v) separação por densidade (Loar et al., 1985; citados por Hettiarachchy & Kalapathy, 1999).

### **3.3. Concentrado protéico de soja (CPS)**

#### **3.3.1. Definição, histórico e utilização**

A AAFCO define concentrado protéico de soja (CPS) como “o produto preparado a partir de grãos de soja descascados pela remoção da maior parte do óleo e dos componentes não-protéicos solúveis, e que deve conter pelo menos 70% de proteína (% N x 6,25) em base seca” (’89 Soya Bluebook, citado por Berk, 1992). O CPS é constituído basicamente por proteínas e carboidratos insolúveis (Circle & Smith, 1972).

Os CPSs já eram produzidos industrialmente na década de 30, para uso como adesivo ou na indústria de fabricação de plásticos (Circle & Smith, 1972). O primeiro CPS de grau alimentício foi produzido pela empresa Griffith Laboratories (Alsip, Illinois) em 1959 por lavagem dos açúcares solúveis do farelo de soja (Hettiarachchy & Kalapathy, 1999). Os CPSs foram desenvolvidos para melhorar duas características da FSD que limitavam suas aplicações: aumentar o teor de proteína (cerca de 50-55% de proteína na FSD x 70% do CPS, em base seca) e melhorar o sabor “beany”. Um dos maiores objetivos do processamento de CPS justamente é remover os compostos responsáveis pelo amargor e sabor “beany” (Berk, 1992).

O CPS é utilizado na indústria cárnea, de panificação e de bebidas, assim como os IPSs e FSDs, devido as suas propriedades funcionais tecnológicas, listadas no Quadro 5.

Quadro 5: Propriedades funcionais tecnológicas de IPS e CPS em alimentos.

Propriedade funcional tecnológica	Modo de ação	Tipo de Alimento	Ingrediente de soja
Solubilidade	Solvatação de proteínas, pH dependente	Bebidas	FSD, CPS, IPS
Absorção e retenção de água	Formação de pontes de hidrogênio, retenção de água	Carnes, salsicha, pães, bolos	FSD, CPS
Viscosidade	Espessamento, retenção de água	Sopas e molhos	FSD, CPS, IPS
Gelificação	Formação de matriz protéica	Carnes, queijos	CPS, IPS
Coesão-adesão	Proteína age como material adesivo	Salsichas, produtos de panificação e massas alimentícias	FSD, CPS, IPS
Elasticidade	Pontes dissulfeto em géis deformáveis	Carnes e produtos de panificação	IPS
Emulsificação	Formação e estabilização de emulsões como gordura	Salsichas, sopas, bolos	FSD, CPS, IPS
Absorção de gordura	Retenção de gordura livre	Carnes, salsichas, “donuts”	FSD, CPS, IPS
Retenção de aroma	Adsorção, aprisionamento	Análogos de carne, produtos de panificação	CPS, IPS
Formação de espuma	Formação de filme protéico para retenção de gases	Toppings para bebidas, sobremesas, produtos aerados	IPS
Controle de cor	Branqueamento (ação de lipoxigenase)	Pães	FSD

Fonte: Adaptado de Kinsella (1979), citado por Hettiarachchy & Kalapathy (1999).

A legislação brasileira (Resolução CNNPA nº 14, de 28 de junho de 1978) estabelece o seguinte padrão de identidade e qualidade para CPS (Tabela 5):

Tabela 5: Padrão brasileiro de identidade e qualidade para CPS

Apresentação	Pó fino, de cor, odor e sabor próprios
Características físico-químicas	
Proteínas (% N x 6,25) (% mín. em base seca)	68
Fibra bruta (% máx.)	5
Umidade (% máx.)	8
Gordura (% máx.)	1
Cinzas (% máx.)	5
Índice de proteína dispersível (IDP) (% mín.)*	5
Fragmentos de insetos (em 100 g)	Ausente
Características microbiológicas	
Contagem total de mesófilos (UFC/g máx.)	$5,0 \times 10^4$
Coliformes totais (em 1 g)	Ausente
Bolores e leveduras (UFC/g máx.)	$1,0 \times 10^3$
<i>Salmonella spp</i> (em 50 g)	Ausente

Fonte: CNPPA (1978)

### 3.3.2. Processos de produção de CPS

Basicamente, são três os métodos de obtenção de CPS:

1. Precipitação com solução alcoólica;
2. Precipitação com solução ácida;
3. Desnaturação por vapor e lavagem com água quente.

As propriedades funcionais tecnológicas são largamente afetadas pelo tipo de processamento. Os CPSs obtidos por desnaturação térmica estão irreversivelmente desnaturados, e sua cor é mais escura do que a dos CPSs obtidos pelos demais processos. Os CPSs obtidos por precipitação com álcool apresentam baixo IDP (entre 10 e 15%) devido à desnaturação protéica causada pelo álcool aquoso, mas as alterações são menos drásticas do que no tratamento com calor. Entretanto, o produto precipitado por solução alcoólica retém a maior parte das propriedades funcionais tecnológicas (viscosidade,

emulsificação e retenção de água) apesar de sua baixa solubilidade (Berk, 1992). O CPS obtido por precipitação com solução ácida pode ter seu IDP aumentado pela neutralização a pH próximo da neutralidade (6,7 – 7,0) (Circle & Smith, 1972).

O processo de CPS remove a maior parte dos compostos responsáveis pelo sabor “beany”, de forma que os CPSs apresentam sabor relativamente brando. Os oligossacarídeos rafinose e estaquiose, que poderiam causar flatulência, também são removidos no processo (Berk, 1992).

A Figura 12 a seguir resume o processo de produção de CPSs em escala industrial.

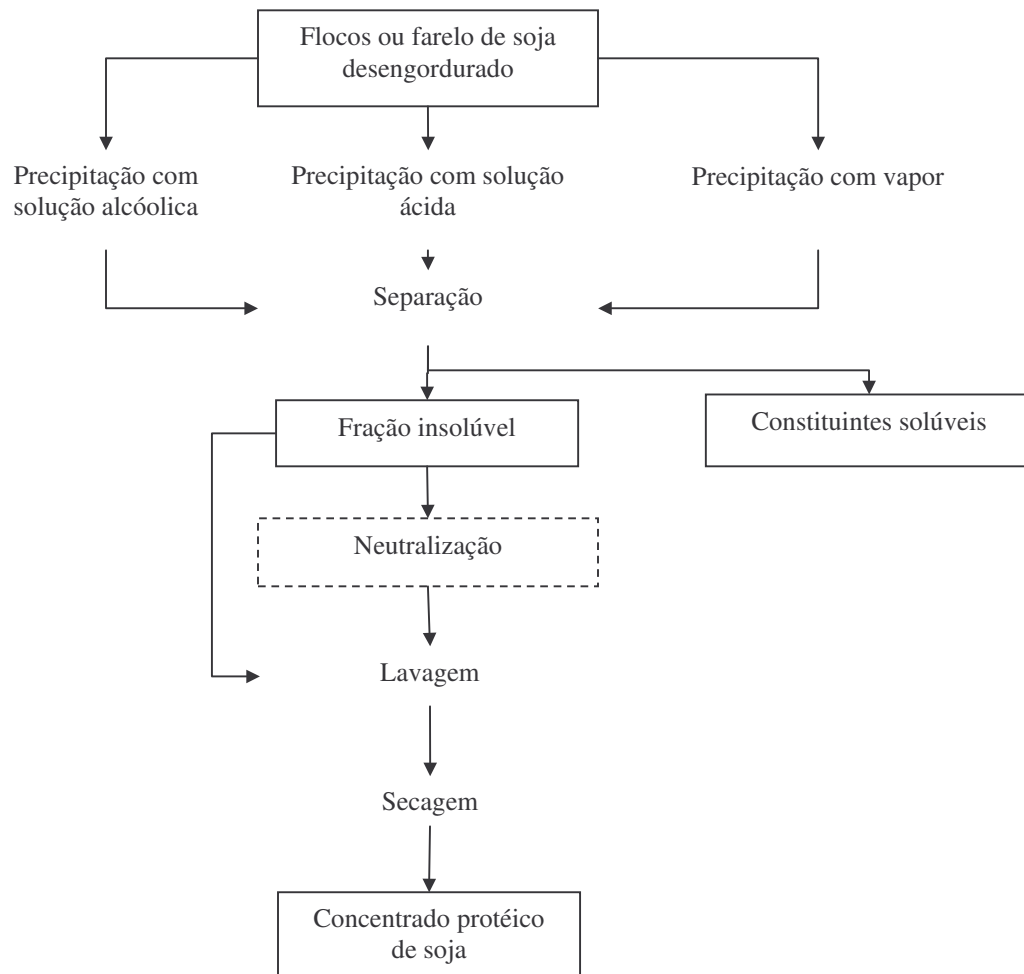


Figura 12: Fluxograma de produção de CPSs em escala industrial (Hettiarachchy & Lalapathy, 1999).

### 3.3.2.1. Precipitação com solução alcóolica

Este processo está baseado na capacidade de soluções de álcoois alifáticos (metanol, etanol e isopropanol) de extraírem a fração de açúcares solúveis da farinha de soja desengordurada sem solubilizar as proteínas (Berk, 1992). A concentração de álcool utilizada varia entre 60 a 80% (Circle & Smith, 1972), sendo 60% (p/p) considerada como ótima (Berk, 1992). O processo consiste das seguintes etapas (Berk, 1992):





- a) Extração líquido/sólido: pode ser realizada em bateladas ou de forma contínua. O processo contínuo é aplicado para operações em grande escala. Processos contínuos são adotados por plantas com capacidade de processamento acima de 5.000 ton/ano (Campbell et al., 1985). Dessa forma, o processo em batelada é mais largamente utilizado em equipamentos semelhantes aos utilizados na extração de óleo: extratores horizontais ou extratores de parede rotatória. Como os álcoois são altamente inflamáveis, é necessário adotar precauções para evitar incêndios e explosões. A matéria-prima utilizada são flocos ou farelo de soja com alto IDP (ainda que o processo promova desnaturação protéica), pois a percentagem de açúcares solúveis é maior em flocos brancos do que nos tostados. Nestes últimos os açúcares sofreram caramelização ou ligaram-se às proteínas por reação de Maillard. Como resultado das reações de condensação, os açúcares não são mais extraídos pelo solvente, permanecendo no produto, diminuindo a concentração de proteína e alterando a cor e o sabor, além do valor nutricional (menor quantidade de lisina disponível) (Berk, 1992).
- b) Remoção e recuperação do solvente: os álcoois são removidos por evaporação e recuperados por destilação. A concentração da solução é corrigida, e o álcool recirculado pelo extrator. O resíduo da destilação é uma solução aquosa de açúcares e outros solúveis, que é concentrada até atingir a consistência de xarope e é vendida como “melaço de soja”. Este subproduto contém 50% de sólidos solúveis, dos quais 60% são carboidratos, 10% proteínas e outros compostos nitrogenados, 10% sais minerais e 20% lipídios. Esse “melaço” é usado como ingrediente calórico ou agente de liga em rações animais.
- c) Dessolventização dos sólidos: depois da precipitação, o precipitado é dessolventizado com métodos semelhantes aos usados na remoção de hexano (solvente de extração de óleo) dos flocos de soja. A dessolventização “flash” é largamente usada, e qualquer excesso de água retido é removido por secagem com ar quente.

- d) Moagem: caso necessário, o produto é moído, utilizando-se os mesmos equipamentos do processo de FSD.

### **3.3.2.2. Precipitação com solução ácida**

Neste processo, os flocos de soja ou farelo branco são suspensos em solução ácida (na proporção de 1:10 ou 1:20 de farelo:solvente) a pH 4,5 (pH isoeletrico da proteína de soja), para remoção dos carboidratos solúveis. A extração típica é conduzida por 30 - 45 minutos (ou até mesmo 1 hora, segundo Zangelmi, 1982) a 25-40 °C (Hettiarachchy & Kalapathy, 1999). O processo com ácido tem vantagens em relação ao processo anterior, pois utiliza um solvente não inflamável e de baixo custo: a água. Entretanto, a separação dos sólidos é dificultada, uma vez que os flocos ou farelo absorvem água, forçando o uso de filtros rotatórios à vácuo ou centrífugas decantadoras auto-deslodantes (Berk, 1992). Os sólidos são lavados e podem ser moídos e secos, originando os CPSs isoeletricos, de baixo IDP. Para obtenção de produtos com alto IDP (acima de 60%), os sólidos são ressuspendidos em água e o pH neutralizado a 7,0 por adição de bases. A suspensão passa por moagem úmida e *spray-dryer*, originando os CPSs neutralizados (Berk, 1992).

O extrato líquido contendo açúcares, minerais e a fração de proteínas solúveis a pH 4,5 é comumente chamado de “soro”, em analogia ao processo de fabricação de queijos. Este soro não apresenta atualmente aplicação comercial, e é considerado um descarte de processo, não sendo utilizado para ração animal pelas mesmas razões apresentadas para o soro do processo de IPS (Berk, 1992).

### **3.3.2.3. Desnaturação por vapor/lavagem com água**

Neste processo, as proteínas presentes no farelo/flocos de soja são desnaturadas por exposição ao vapor de água, o que as torna insolúveis em água. Os carboidratos solúveis e

sais são então removidos por lavagem com água quente, e o produto moído e seco (Norri, 1964; citados por Hettiarachchy & Kalapathy, 1999). Os equipamentos utilizados são basicamente os mesmos do processo com solução ácida. Alternativamente, a matéria-prima pode ser lavada com água ou solventes orgânicos em temperaturas de 66 - 93 °C na faixa de pH de 5,3 – 7,5 (McAnelly, 1964; citado por Hettiarachchy & Kalapathy, 1999).

### **3.3.3. Rendimentos do processo**

Os rendimentos industriais variam na faixa de 60 - 75%, com base no peso da matéria-prima inicial (Circle & Smith, 1972; Berk, 1992). O custo do CPS é de cerca de 2 a 2,5 vezes o custo da FSD. Considerando o percentual de proteína dos dois produtos, o custo por unidade de peso de proteína é 80% maior no CPS (Berk, 1992).



## **4. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1. Materiais**

#### **4.1.1. Matéria-prima**

A farinha de soja desengordurada não tratada termicamente (PROSAM R, lote A-14/07/01) foi cedida pela Bunge Alimentos, Esteio, RS. Segundo informações do fabricante, essa farinha é a matéria-prima utilizada pela empresa para a produção de IPSs comerciais, sendo obtida através do processamento industrial de grãos de soja limpos, quebrados, descascados e desengordurados por hexano, sendo dessolventizada a vácuo para minimizar a desnaturação protéica.

#### **4.1.2. Reagentes**

A água utilizada nas análises cromatográficas foi deionizada em colunas de troca-iônica (Simplicity®, Millipore do Brasil) e filtrada por meio de membranas de 0,22 µm (Millipore do Brasil). Todos os reagentes de grau analítico ou cromatográfico foram comprados da Merck Co. Os padrões de isoflavonas daidzina, genistina, daidzeína e genisteína foram comprados da Sigma Chemical Co (St. Louis, EUA).

### **4.2. Métodos**

#### **4.2.1. Obtenção de IPS em escala laboratorial**

O IPS foi preparado conforme o método de Wang et al. (1998), com adaptações para condições de otimização de rendimento protéico (Berk, 1979), como ilustrado na Figura 13. Primeiramente, uma amostra de cinquenta gramas (50,00 g) de FSD foi suspensa em 1 L de água destilada e o pH da mistura ajustado para 9,0 por adição de solução de NaOH 4 N. O tempo de extração foi de 45 minutos a 55 °C, sob agitação. A suspensão foi centrifugada a 13.000 x g (25 °C) por 20 minutos (Centrífuga Beckman, modelo J-21), e o resíduo



insolúvel coletado e liofilizado. O sobrenadante teve o pH ajustado para 4,5 por adição de solução de HCl 6 N, sofrendo agitação por 1 hora à temperatura ambiente. A seguir, a suspensão foi centrifugada novamente por 20 minutos a 13.000 x g (5 °C) e o precipitado (IPS isoeletrico) coletado e liofilizado. O sobrenadante foi dividido em alíquotas: uma para liofilização e quantificação de isoflavonas e outra para determinação de proteínas.

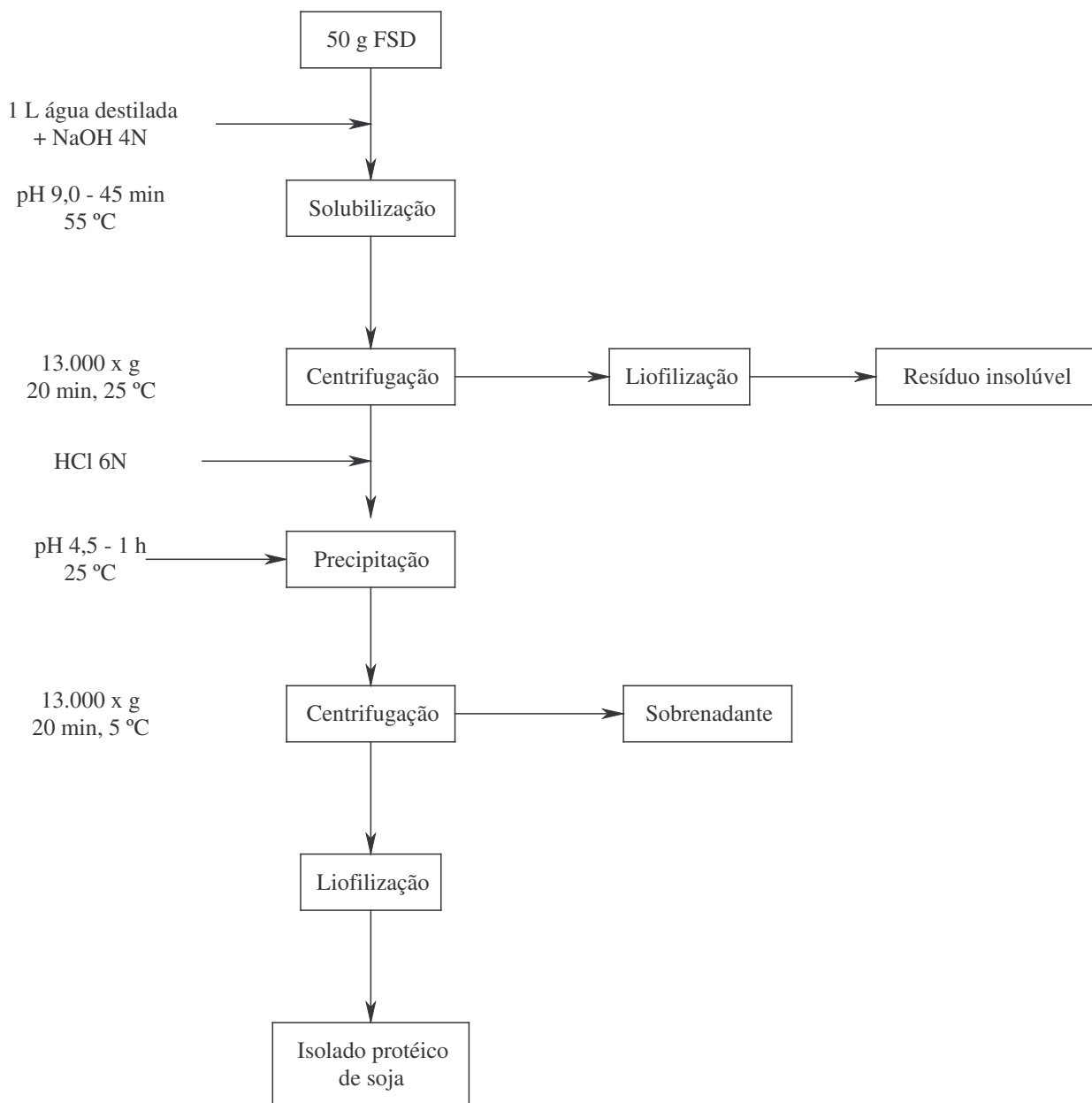


Figura 13: Fluxograma de produção de IPS em escala laboratorial.





#### 4.2.2. Obtenção de CPS em escala laboratorial por precipitação com ácido

O CPS isoelétrico foi obtido pelo método descrito por Zangelmi et al. (1982), conforme ilustrado na Figura 14. Uma amostra de cinquenta gramas (50,00 g) de FSD foi suspensa em 1 L de água destilada e o pH da suspensão ajustado para 4,5 por adição de solução de HCl 6 N. Após agitação por 1 hora à temperatura ambiente, a mistura foi centrifugada por 20 minutos a 13.000 x g (5 °C) e o precipitado coletado e liofilizado para análises posteriores. O sobrenadante também foi coletado para análise.

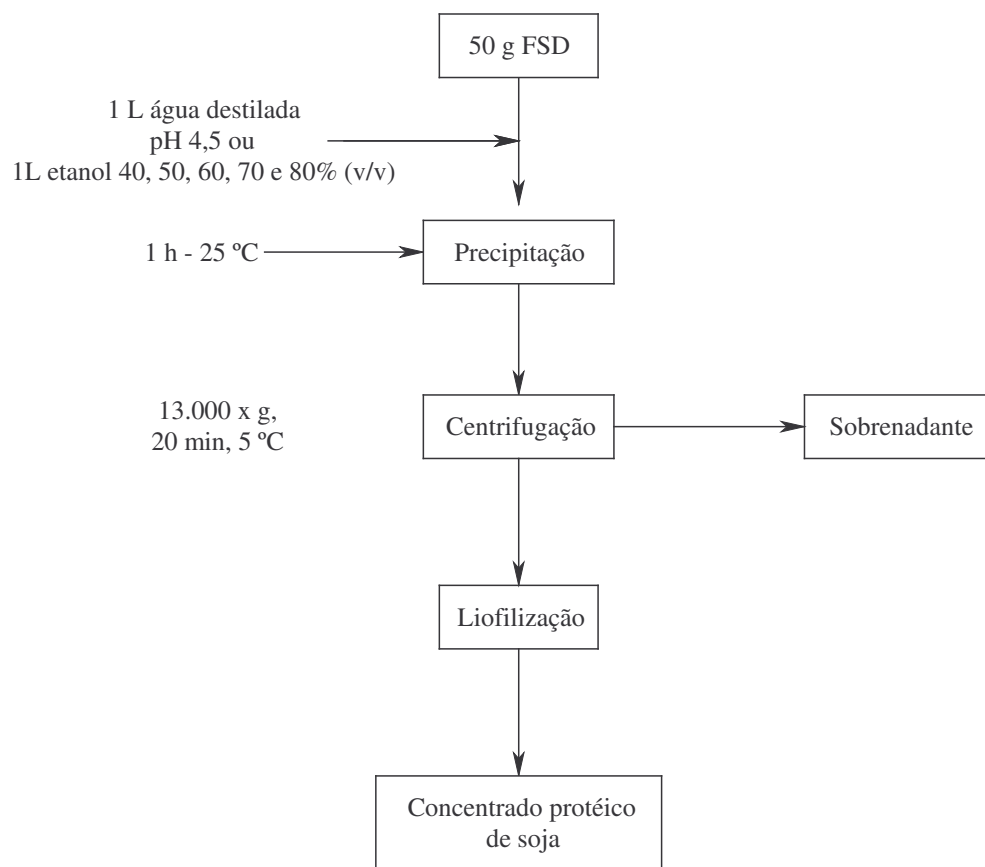


Figura 14: Fluxograma de produção de CPSs em escala laboratorial



#### **4.2.3. Obtenção de CPSs em escala laboratorial por precipitação alcoólica**

Os CPSs precipitados com álcool foram preparados em escala laboratorial segundo o método de Campbell et al. (1985, adaptado), como ilustrado também na Figura 14. Uma amostra de cinquenta gramas (50,00 g) de FSD foi dispersa em 1 L de solução de etanol aquoso nas concentrações de 40, 50, 60, 70 e 80% (v/v), com agitação por 1 hora à temperatura ambiente. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas por 20 minutos a 13.000 x g (5°C) e os precipitados protéicos coletados e liofilizados. Os sobrenadantes também foram coletados para posterior quantificação de isoflavonas e determinação de proteínas.

#### **4.2.4 - Extração de isoflavonas**

As amostras liofilizadas (1,00 g para amostras sólidas e 0,50 g para sobrenadantes) foram submetidas à extração com 10 volumes de metanol 80% (v/v) por 1 h a 26 °C, em tubos fechados sob agitação (Barnes et al., 1994, modificado). A seguir, procedeu-se a centrifugação a 5.500 x g por 10 minutos e o sobrenadante foi filtrado em membrana de PTFE de porosidade 0,22 µm (Millipore do Brasil) para análise cromatográfica.

Após extração das isoflavonas dos CPSs obtidos por precipitação alcoólica, os extratos metanólicos foram concentrados 2 vezes por evaporação do solvente usando nitrogênio como gás de arraste e imediatamente analisados por CLAE.

#### **4.2.5 - Determinação de isoflavonas por CLAE**

Os extratos metanólicos foram analisados por cromatografia líquida de alta eficiência, de acordo com o método descrito por Koo et al. (2000) e modificado por Park et al. (2002 a). Alíquotas de 20 µL foram injetadas automaticamente no cromatógrafo utilizando coluna YMC PACK ODS-A, S-5 µm, 120 Å; 4,6 φ- 250 mm e detector de

arranjo de fotodiodos (SPD-M10 AVP, Shimadzu Co.). As isoflavonas foram isoladas utilizando gradiente e eluição, com uma vazão de solvente de 0,5 mL/min, mantendo-se a temperatura da coluna a 30 °C. A fase móvel (solvente A) consistiu de uma mistura de água:ácido acético (19:1), enquanto o solvente B usado foi metanol. O gradiente foi iniciado com 20% de solvente B, passando para 40% em 15 min, subindo a 50 % entre 15 e 55 min, atingindo 80% em 95 min, decrescendo para 20% entre 95 e 105 min. A coluna foi reequilibrada com 20% de B por 15 min entre as corridas. A detecção foi feita pela absorção a 254 nm e o espectro de absorção medido de 200 a 300 nm.

As concentrações de daidzina, genistina, daidzeína e genisteína foram calculadas com base nas curvas dos padrões autênticos (Sigma Co. EUA). Como não havia padrões de glicitina disponíveis no momento do estudo, suas concentrações e as de seus conjugados foram calculadas pela curva-padrão de daidzina, conforme descrito por Barnes et al. (1994) e Coward et al. (1998). Como Kudou et al. (1991 b) demonstraram que os coeficientes de extinção molar de malonil daidzina e de malonil genistina se aproximam dos coeficientes de daidzina e genistina, respectivamente, as concentrações dos malonil glicosídeos e acetil glicosídeos foram calculados pelas curvas-padrão dos respectivos  $\beta$ -glicosídeos (Barnes et al., 1994 e Coward et al., 1998) e os valores foram normalizados considerando-se as diferenças de massa molecular das formas glicosiladas, multiplicando-se a massa de cada derivado pela razão entre a massa molecular da respectiva aglicona e a massa molecular da forma glicosilada, conforme descrito por Kudou et al. (1991 b) e Song et al. (1998).

#### **4.2.6 Determinação de proteínas**

O teor de proteínas em cada parte do processamento e nos produtos finais foi determinado pelo método de Kjeldahl – AOAC 960.52 (1997), usando o fator de conversão de 6,25, que é o fator adotado pela legislação brasileira e comumente usado pela indústria de processamento de soja.

#### **4.2.7 Determinação de umidade e sólidos totais**

O percentual de umidade das amostras sólidas foi determinado pelo método AOAC 925.10 (1997) e o teor de sólidos totais das amostras líquidas, pelo método AOAC 920.193 (1997).

#### **4.2.8. Análise estatística**

Os processamentos de IPS, CPS ácido e CPS con etanol 60% (v/v) foram realizados em triplicata, e os demais processamentos de CPSs etanólicos em duplicata. As amostras geradas em cada fase do processo foram analisadas em triplicata. A análise estatística foi feita por meio do software Statistica (versão 5.0, 1995), desenvolvido pelo Statsoft Inc, Tulsa. As diferenças entre as médias foram analisadas pelo teste de LSD (*Least Significant Difference*) para  $\alpha = 0,05$ .



## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. Processamento de IPS em escala laboratorial

O rendimento do processamento de IPS em escala laboratorial foi de  $38 \pm 1\%$  (p/p), compatível com os índices indicados por Zangelmi et al. (1982). Esse rendimento foi maior que o de 17,8 % obtido por Wang & Murphy (1996) e o de 28,9% obtidos por Wang et al. (1998). As diferenças no rendimento se devem provavelmente às condições de extração utilizadas, como pH e temperatura. Enquanto esses autores extraíram a proteína a pH 8,5 e 8,0, respectivamente, à temperatura ambiente, neste trabalho a proteína foi extraída a pH 9,0, 55 °C, condições ótimas para extração como descritas por Berk (1979). Verificou-se ainda que o produto obtido corresponde à definição de IPS, por apresentar mais de 90% de proteína (N x 6,25) em base seca (Tabela 6).

Tabela 6: Balanço de massa global para processamento de IPS em escala laboratorial e teores de proteína e isoflavonas nas correntes de processo (matéria-prima, produto final e efluentes).

<i>Material</i>	<i>Massa total (g)</i>	<i>Massa seca (g)</i>	<i>% proteína (b.s.)</i>	<i>Isoflavonas totais (g)</i>	<i>Isoflavonas (<math>\mu\text{g/g b.u.}</math>)</i>	<i>Isoflavonas (<math>\mu\text{g/g b.s.}</math>)</i>
FSD	50,0	$45,9 \pm 0,1$	$56,0 \pm 0,3$	$69,1 \pm 0,8$	$1.380 \pm 20$	$1.500 \pm 20^b$
IPS	$19,1 \pm 0,6$	$18,3 \pm 0,5$	$95,2 \pm 1,0$	$12,5 \pm 0,4$	$650 \pm 50$	$690 \pm 40^c$
Resíduo	$14,8 \pm 0,4$	$14,0 \pm 0,4$	$38,2 \pm 0,7$	$8,3 \pm 0,4$	$550 \pm 10$	$590 \pm 20^d$
Sobrenadante	$902 \pm 3$	$13,8 \pm 0,2$	$17,4 \pm 0,1$	$36 \pm 3$	$17 \pm 2$	$2.600 \pm 200^a$

Resultados expressos como média  $\pm$  dp para  $n = 3$  (número de repetições do processamento). Análises realizadas em triplicata.

Letras iguais na mesma coluna indicam que os resultados não são significativamente diferentes para  $\alpha = 0,05$ .

O teor total de isoflavonas expresso em base úmida encontrado na FSD ( $1.500 \mu\text{g/g b.u.}$ ) pareceu ser inferior ao determinado por Genovese & Lajolo (2001) para FSD do mesmo fabricante. Esses autores analisaram 3 lotes diferentes de farinha, encontrando





concentrações de 1565 a 2032  $\mu\text{g/g}$  b.u.. A quantidade total de isoflavonas e o perfil de distribuição destas nos grãos de soja são afetados pelo tipo de cultivar, local de plantio, tipo de solo, clima e ano da safra (Wang & Murphy, 1994; Hoeck et al., 2000, Vyn et al., 2002). As diferenças observadas entre os dois trabalhos se devem provavelmente à diferença de matéria-prima (grãos de soja) utilizada, e conseqüentemente, dos lotes de farinha analisados.

O balanço de massa de proteínas do processamento de IPS (Figura 15) mostra que o IPS reteve 67,9% das proteínas contidas na FSD, enquanto que quase 30% das proteínas da FSD foram perdidas no resíduo insolúvel (19,6%) e no sobrenadante (9,3%).

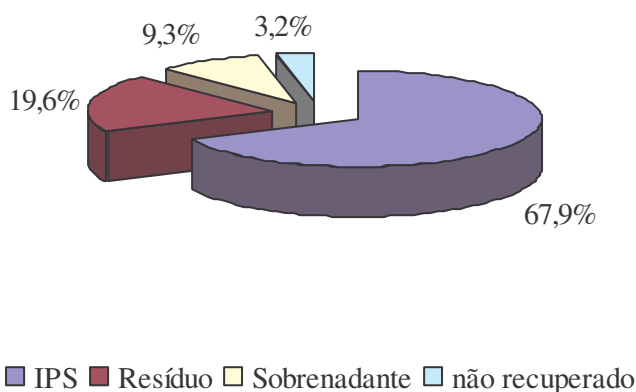


Figura 15: Percentual de retenção das proteínas presentes na FSD nas correntes do processamento de IPS em escala laboratorial.

A Figura 16 ilustra o balanço de massa de isoflavonas totais para o processamento de IPS em escala laboratorial. O produto principal, IPS, apresentou retenção de 18,1% das isoflavonas presentes na FSD, enquanto que o sobrenadante, descarte do processo, contém mais da metade das isoflavonas presentes na matéria-prima original FSD, fato também observado por Elridge (1982). O resíduo insolúvel (*okara*) apresentou 38,2% de proteína em base seca e contém 12% das isoflavonas originalmente presentes na FSD, o que torna interessante seu aproveitamento industrial.



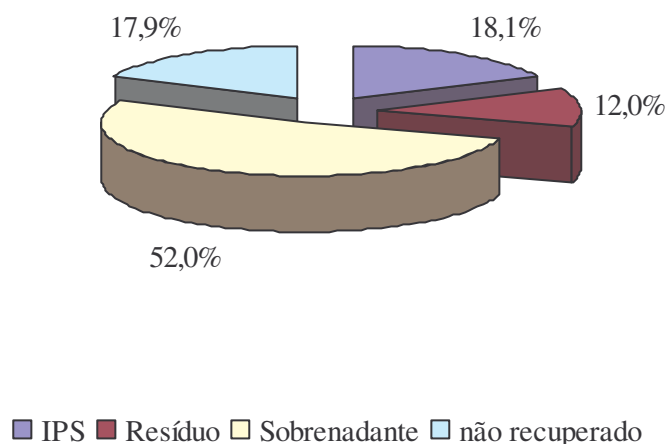


Figura 16: Percentual de retenção de isoflavonas totais nas correntes de processamento de IPS em escala laboratorial.

O percentual de retenção verificado nas diferentes correntes do processamento de IPS deste estudo foi diferente daqueles verificados por Wang & Murphy (1996) e por Wang et al. (1998) em estudos de balanços de massa de processamento de IPS. Esses autores encontraram retenção de isoflavonas no IPS de 48,3 e 25,8%, respectivamente. Para Wang & Murphy (1996), a maior perda no processo foi verificada no resíduo insolúvel (52,9% das isoflavonas totais da FSD), com o sobrenadante retendo apenas 3,3%, enquanto que para Wang et al. (1998), a maior perda ocorreu na água de lavagem do processo (21,6%), seguida do resíduo insolúvel (19,0%) e sobrenadante (14,3%). A diferença nos percentuais de retenção deve-se provavelmente às condições de processamento, tais como a relação volume de solvente/FSD, pH da solução alcalina, tempo e temperatura da solubilização das proteínas. Neste trabalho, foi usada uma relação volume solvente/FSD de 20:1, enquanto que os demais trabalhos usaram uma proporção menor, de 10:1. O maior volume de solvente pode ter promovido uma maior lixiviação das isoflavonas da FSD para



a solução alcalina, e essas isoflavonas não teriam sido precipitadas juntamente com a proteína na etapa de redução de pH, permanecendo no sobrenadante. Segundo Wang & Murphy (1996), o pH alcalino pode modificar as cargas de isoflavonas e proteínas, desfazendo a associação entre isoflavonas e proteínas, o que também facilitaria a perda de isoflavonas para os efluentes do processo.

A fração não-recuperada de isoflavonas correspondeu a 17,9% do total presente na FSD, comparável com a fração não-determinada (19,4%) observada por Wang et al. (1998) em processo semelhante. A diferença entre o total determinado nas correntes de processo e o total presente na FSD poderia ser atribuída a degradações de isoflavonas ocorridas na etapa de precipitação ácida das proteínas. Genovese e Lajolo (2001) concluíram que ocorre degradação de isoflavonas em meio ácido, por essa razão, a extração em meio ácido de isoflavonas em métodos analíticos quantitativos têm sido evitada.

A Tabela 7 mostra a concentração de cada isoflavona para o produto e subprodutos do processamento de IPS.

Tabela 7: Concentração de isoflavonas nas correntes de processamento de IPS em escala laboratorial ( $\mu\text{g/g}$  b.s.).

Isoflavona	Farinha de soja ( $\mu\text{g/g}$ b.s.)	Isolado protéico ( $\mu\text{g/g}$ b.s.)	Resíduo ( $\mu\text{g/g}$ b.s.)	Sobrenadante ( $\mu\text{g/g}$ b.s.)
Daidzina	211 <sup>b</sup>	79 <sup>c</sup>	114 <sup>c</sup>	550 <sup>a</sup>
Glicitina	30 <sup>b</sup>	12 <sup>c</sup>	15 <sup>c</sup>	110 <sup>a</sup>
Genistina	284 <sup>b</sup>	165 <sup>c</sup>	209 <sup>c</sup>	580 <sup>a</sup>
Malonil daidzina	367 <sup>b</sup>	98 <sup>c</sup>	72 <sup>c</sup>	590 <sup>a</sup>
Malonil glicitina	42 <sup>b</sup>	14 <sup>c</sup>	9 <sup>c</sup>	80 <sup>a</sup>
Acetil daidzina	22 <sup>b</sup>	10 <sup>c</sup>	6 <sup>d</sup>	26 <sup>a</sup>
Malonil genistina	444 <sup>b</sup>	146 <sup>c</sup>	109 <sup>c</sup>	540 <sup>a</sup>
Daidzeína	35 <sup>b</sup>	72 <sup>a</sup>	21 <sup>b</sup>	69 <sup>a</sup>
Acetil genistina	39 <sup>a</sup>	23 <sup>b</sup>	13 <sup>c</sup>	26 <sup>b</sup>
Genisteína	31 <sup>b</sup>	67 <sup>a</sup>	27 <sup>b</sup>	32 <sup>b</sup>
Total	1500 <sup>b</sup>	690 <sup>c</sup>	590 <sup>c</sup>	2.600 <sup>a</sup>

Resultados expressos como média para  $n = 3$  (número de repetições do processamento). Análises realizadas em triplicata.

Letras iguais na mesma linha indicam que os resultados não são significativamente diferentes para  $\alpha = 0,05$ .

As formas malonil glicosídeos representam mais de 50% do total de isoflavonas na FSD, enquanto os  $\beta$ -glicosídeos predominam no resíduo, indicando conversão durante a extração alcalina (Figura 17). As formas agliconas, que representam somente 4,4 % do total na FSD, perfazem 20% do total de isoflavonas do IPS, o que indica conversão por hidrólise durante o processo. O aumento do teor de isoflavonas agliconas no produto final também foi observado por Wang & Murphy (1996) e Wang et al. (1998). O aumento do percentual de acetil glicosídeos no IPS deve-se provavelmente à conversão de malonil glicosídeos a acetil glicosídeos provocada pelo aquecimento na etapa de solubilização de proteínas, como citado por Wang & Murphy (1994 a) e Wang et al. (1998). Na Figura 18, são apresentados os perfis cromatográficos dos extratos metanólicos de cada corrente de processo de IPS.

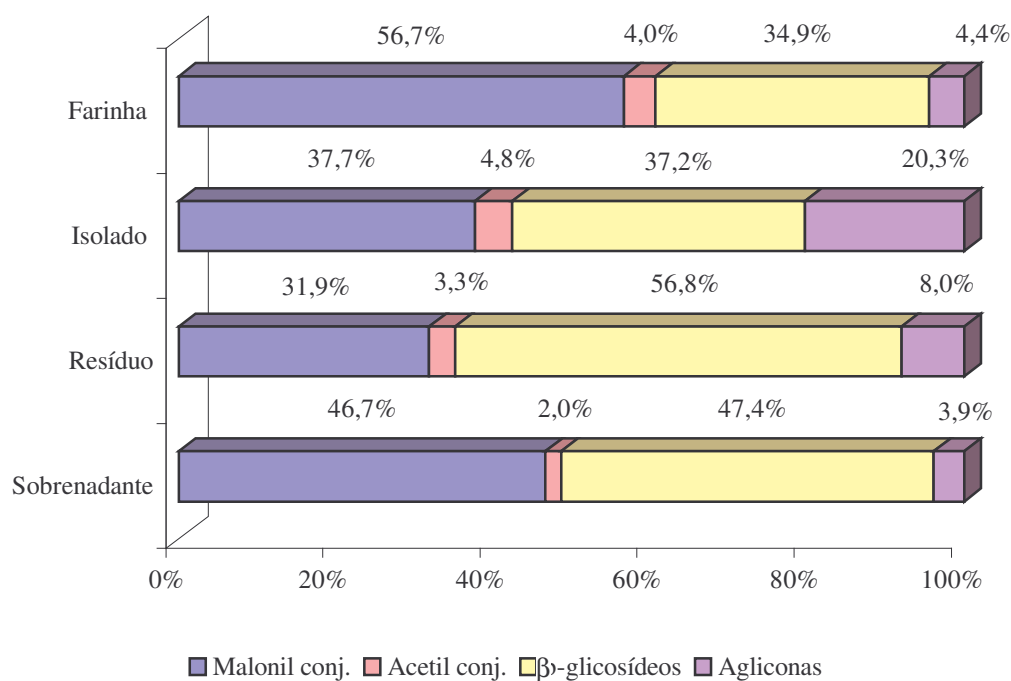


Figura 17: Distribuição percentual de formas de isoflavonas em correntes de processamento IPS em escala laboratorial (em base seca).

conj.: conjugados





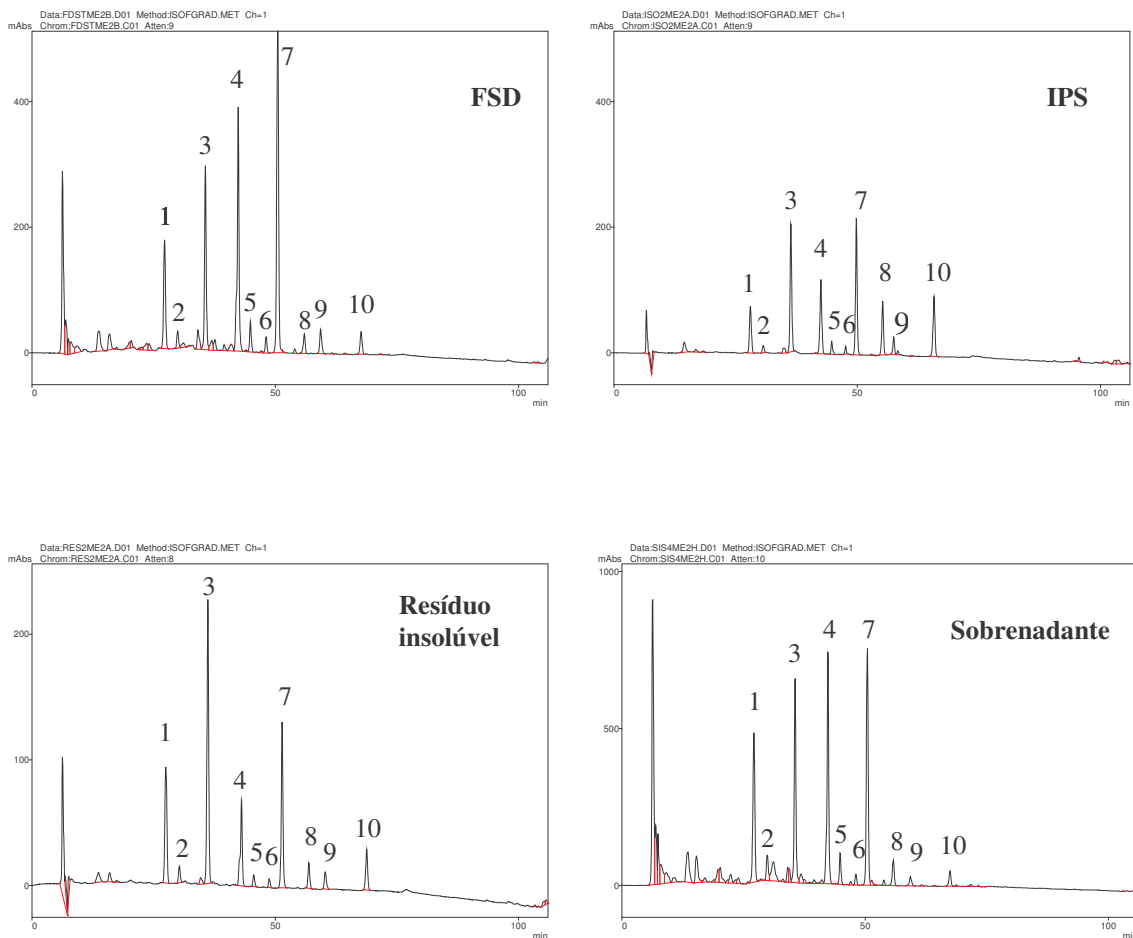


Figura 18: Perfis cromatográficos de isoflavonas nas correntes de processamento de IPS em escala laboratorial. Isoflavonas: 1: daidzina; 2: glicitina; 3: genistina; 4: malonil daidzina; 5: malonil glicitina; 6: acetil daidzina, 7: malonil genistina; 8: daidzeína; 9: acetil genistina; 10: genisteína. Condições cromatográficas: coluna YMC PACK ODS-A, S-5  $\mu\text{m}$ , 120  $\text{\AA}$ ; 4,6  $\phi$ - 250 mm. Fluxo de 0,5 mL/min, temperatura da coluna: 30  $^{\circ}\text{C}$ . Solvente A: ácido acético 5% (v/v) em água, solvente B: metanol aquoso 80% (v/v). Gradiente iniciado com 20% de solvente B, passando para 40% em 15 min, subindo a 50 % entre 15 e 55 min, atingindo 80% em 95 min, decrescendo para 20% entre 95 e 105 min. A coluna foi reequilibrada com 20% de B por 15 min entre as corridas. A detecção foi feita pela absorção a 254 nm.

Observação: embora as isoflavonas de interesse fossem totalmente eluídas até 75 min, foi mantido o método adotado pelo Laboratório de Bioquímica da FEA-UNICAMP, com corrida até 105 min e mais 15 min de reequilíbrio da coluna entre corridas.



O sobrenadante do processo apresenta um percentual das formas malonil glicosídeos e  $\beta$ -glicosiladas em torno de 47%, e somente 3,9% de isoflavonas agliconas. A diferença do perfil de distribuição entre IPS e sobrenadante pode ser atribuída à solubilidade das isoflavonas: as formas agliconas são menos solúveis em água que as formas glicosiladas e conjugadas. O perfil dos efluentes de processo (resíduo alcalino e sobrenadante) indica que, para sua recuperação e aproveitamento como fonte de isoflavonas, tais substratos poderiam ser submetidos a tratamento térmico e conversão enzimática, para aumento do teor de isoflavonas agliconas. O tratamento térmico em soluções aquosas promove a conversão das formas malonil glicosídeos a  $\beta$ -glicosídeos (Park et al., 2002 b) e os  $\beta$ -glicosídeos podem ser hidrolisados a agliconas pela ação de  $\beta$ -glicosidases (Park et al., 2002 a; 2003).

Ao se comparar o perfil percentual de isoflavonas na FSD usada neste estudo com os perfis obtidos por Genovese e Lajolo (2001) (Tabela 8), que analisaram FSD do mesmo fabricante, verifica-se que os valores são semelhantes, com exceção do percentual de malonil daidzina, genistina e agliconas. A relação daidzina total/genisteína total para a FSD deste estudo foi de 1:1,3, enquanto que a média obtida por Genovese e Lajolo foi de 1:2,1. Essa diferença, assim como a diferença observada na concentração de isoflavonas totais das FSDs, pode ser atribuída a diferenças de matéria-prima (grão de soja). Aguiar (2004), ao analisar vários cultivares de soja plantados no Brasil, observou grande variabilidade nos teores e perfis de isoflavonas nos grãos, que são influenciados pelos aspectos genéticos do cultivar, condições climáticas e do solo no local de plantio (Hoeck et al., 2000). Gliciteína não foi detectada nem na FSD deste estudo nem nas FSDs analisadas por Genovese & Lajolo (2001), resultado coerente com o obtido por Aguiar (2004), que detectou essa isoflavona em apenas 5 dos 34 cultivares de soja analisados.

O processamento de IPS em nível industrial também promove hidrólise, liberando agliconas, que podem variar nos IPSs comerciais dependendo das condições de processo e da matéria-prima utilizada. A revisão da literatura apresenta tanto percentuais de agliconas baixos, como os 7% observados por Barnes et al. (1994) e Wang & Murphy (1994 a) em IPSs comercializados nos EUA, quanto percentuais altos, como os 47% encontrados por Wang & Murphy (1994 a) em uma marca de IPS americana, ou ainda os 36% e 53%

encontrados por Genovese e Lajolo (2001) para amostras de 2 lotes diferentes do mesmo fabricante de IPSs fabricados no Brasil. O percentual de agliconas presentes no IPS obtido em escala laboratorial neste estudo foi de 20% do total de isoflavonas. Como os processos industriais de IPSs são confidenciais e muitas vezes patenteados, não se podem estabelecer comparações diretas entre as condições de processamento laboratoriais e industriais.

Tabela 8: Comparação do perfil percentual de isoflavonas da FSD e IPS deste estudo e de produtos comerciais brasileiros.

<i>%</i>						
	<i>FSD</i>	<i>FSD</i>		<i>IPS</i>	<i>IPS</i>	
	<i>deste estudo</i>	<i>Genovese e Lajolo, (2001)</i>		<i>deste estudo</i>	<i>Genovese e Lajolo, (2001)</i>	
		<b>Lote A</b>	<b>Lote B</b>		<b>Lote A</b>	<b>Lote B</b>
Malonil daidzina	24,4	13,5	12,5	14,3	6,0	5,6
Malonil glicitina	2,8	0,0	0,5	2,0	0,7	0,0
Malonil genistina	29,5	30,7	33,4	21,3	21,6	20,3
Acetil daidzina	1,5	1,1	1,5	1,4	1,2	0,8
Acetil genistina	2,6	2,4	2,4	3,4	1,9	2,5
Daidzina	14,0	13,3	12,5	11,5	3,2	3,5
Glicitina	2,0	1,1	1,4	1,7	1,1	1,1
Genistina	18,9	28,5	26,4	24,1	10,1	11,0
Daidzeína	2,3	4,0	4,1	10,5	18,9	19,4
Gliciteína	n.d.	n.d	n.d	n.d	1,9	1,7
Genisteína	2,1	5,5	5,2	9,8	33,3	34,0
Total	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0	100,0

n.d.: não detectado

## 5.2. CPS obtidos em escala laboratorial: comparação entre precipitação ácida a pH 4,5 e com etanol 60% (v/v) <sup>1</sup>

O rendimento em peso seco dos processos foi significativamente maior (para  $\alpha=0,05$ ) no processo com precipitação com etanol 60% (v/v): 74,1% contra 72,0% do processo ácido. O rendimento em retenção da proteína total original para o produto obtido por tratamento com etanol é significativamente maior que o obtido no processo por tratamento ácido (Quadro 6) e, conseqüentemente, ocorre maior perda de proteína no sobrenadante resultante do tratamento ácido do que no sobrenadante por tratamento alcoólico. Entretanto, não foi observada diferença significativa no percentual de proteína (em b.s.) dos dois produtos obtidos e ambos correspondem à definição de CPS, por apresentarem teor de proteína acima de 70% em base seca.

Quadro 6: Balanço de massa para proteínas em processamento de CPS em escala laboratorial: comparação entre precipitação ácida a pH 4,5 e com etanol 60% (v/v)

Material	Massa total (g)		% proteína (b.s.)		Retenção proteína (%)	
	Ácida	Etanol 60%	Ácida	Etanol	Ácida	Etanol
FSD	50,0		56,0 $\pm$ 0,3		100	
CPS	34,4 $\pm$ 0,3	35,1 $\pm$ 0,1	72,7 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	72,6 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	93,4 $\pm$ 0,4 <sup>b</sup>	95,9 $\pm$ 0,7 <sup>a</sup>
Sobrenadante	926 $\pm$ 1	835 $\pm$ 5	15,2 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	8,5 $\pm$ 0,3 <sup>b</sup>	7,3 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	3,6 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>

Resultados expressos como média  $\pm$  dp para n = 3 (número de repetições dos processamentos). Análises realizadas em triplicata.

Letras iguais na mesma linha dentro de uma coluna indicam que os resultados não são significativamente diferentes para  $\alpha = 0,05$ .

<sup>1</sup> Para publicação de artigo na Revista Ciência e Tecnologia de Alimentos, foram comparados os processamentos de CPS por precipitação ácida e por precipitação com etanol 60% (v/v). A comparação foi mantida no texto da dissertação, pois segundo Berk (1992), esses são os processos mais aplicados industrialmente.



Embora o tratamento com álcool tenha resultado em menores perdas de proteína no sobrenadante, verificou-se perda de cerca de 90% das isoflavonas contidas na FSD (Figura 19), que são muito solúveis em soluções alcoólicas (Elridge, 1982; Kudou et al., 1991 a). Pandjaitan et al. (2000), que quantificaram daidzina, genistina e suas respectivas agliconas em processos de obtenção de concentrado protéico, chegaram a uma conclusão semelhante. O CPS obtido por esse método retém apenas 7,5% das isoflavonas presentes originalmente na FSD, apresentando 153  $\mu\text{g/g}$  b.s., contra 41,7% de retenção do concentrado protéico obtido por precipitação com ácido, que contém 871  $\mu\text{g/g}$  b.s. de isoflavonas (Quadro 7 e Figura 19). Ainda que os processos em escala laboratorial sejam muito diferentes dos processos industriais, a concentração de isoflavonas totais no CPS do processo ácido (838  $\mu\text{g/g}$  b.u.) encontra-se na faixa descrita na literatura para CPSs obtidos por precipitação ácida (entre 612 a 1670  $\mu\text{g/g}$  b.u.; USDA, 1999), enquanto que o CPS obtido por precipitação alcoólica apresentou concentração de isoflavonas totais (147  $\mu\text{g/g}$  b.u.) menor do que a faixa citada na literatura (entre 208 a 318  $\mu\text{g/g}$  b.u., USDA, 1999).

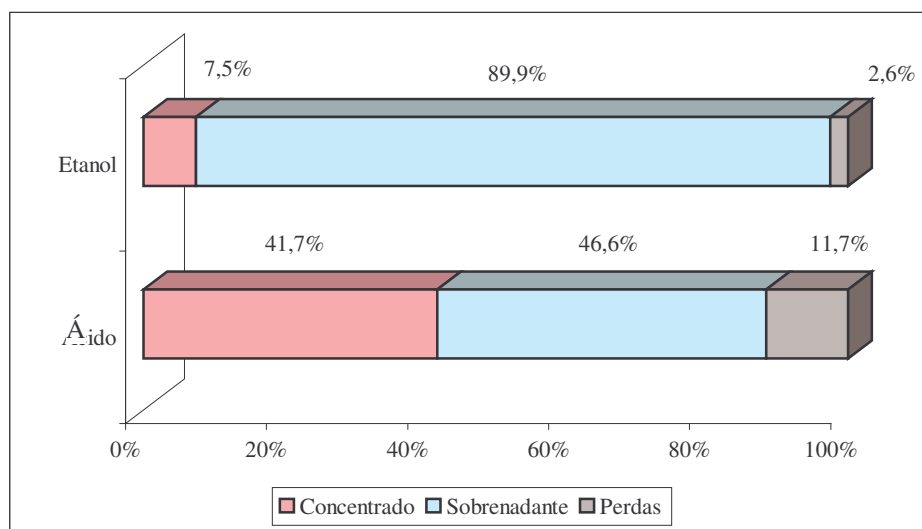


Figura 19: Percentual de retenção de isoflavonas em correntes de processamento de CPSs em escala laboratorial: comparação entre precipitação ácida a pH 4,5 e com etanol 60% (v/v).





Quadro 7: Balanço de massa de isoflavonas para processamento de CPSs em escala laboratorial: comparação entre precipitação ácida a pH 4,5 e com etanol 60% (v/v).

Material	Isoflavonas totais (mg)		Concentração isoflavonas (µg/ g b.u.)		Concentração isoflavonas (µg/ g b.s.)	
	Ácido	Etanol	Ácida	Etanol	Ácida	Etanol
FSD	69,1 ± 0,8		1.370 ± 20		1.500 ± 20	
CPS	28,8 ± 0,3 <sup>a</sup>	5,18 ± 0,01 <sup>b</sup>	838 ± 7 <sup>a</sup>	147 ± 1 <sup>b</sup>	871 ± 10 <sup>a</sup>	153 ± 1 <sup>b</sup>
Sobrenadante	32,2 ± 0,8 <sup>b</sup>	62,19 ± 0,06 <sup>a</sup>	35 ± 1 <sup>b</sup>	75 ± 1 <sup>a</sup>	2.590 ± 30 <sup>b</sup>	5.621 ± 150 <sup>a</sup>

Resultados expressos como média ± dp para n = 3 (número de repetições do processamento). Análises realizadas em triplicata.

Letras iguais na mesma linha para um par de subcolunas indicam que os resultados não são significativamente diferentes para  $\alpha = 0,05$ .

Os resultados da Tabela 9 ilustram o perfil de distribuição de isoflavonas para os dois processamentos de CPSs. Os cromatogramas referentes aos CPSs e sobrenadantes podem ser visualizados na Figura 20.

Tabela 9: Perfil de distribuição de isoflavonas para CPSs obtidos em escala laboratorial: comparação entre precipitação ácida a pH 4,5 e com etanol 60% (v/v)

<i>Isoflavona</i>	<i>FSD</i>	<i>CPS</i>		<i>Sobrenadante</i>	
	( $\mu\text{g/g b.s.}$ )	( $\mu\text{g/g b.s.}$ )		( $\mu\text{g/g b.s.}$ )	
		Ácido	Álcool	Ácido	Álcool
Daidzina	211 <sup>c</sup>	16 <sup>d</sup>	24 <sup>d</sup>	374 <sup>b</sup>	821 <sup>a</sup>
Glicitina	30 <sup>c</sup>	8,2 <sup>d</sup>	2 <sup>d</sup>	80 <sup>b</sup>	155 <sup>a</sup>
Genistina	284 <sup>c</sup>	66 <sup>d</sup>	33 <sup>d</sup>	409 <sup>b</sup>	1.099 <sup>a</sup>
Malonil daidzina	367 <sup>c</sup>	144 <sup>d</sup>	34 <sup>e</sup>	754 <sup>b</sup>	1301 <sup>a</sup>
Malonil glicitina	42 <sup>c</sup>	20 <sup>d</sup>	3 <sup>e</sup>	92 <sup>b</sup>	174 <sup>a</sup>
Acetil daidzina	22 <sup>c</sup>	20 <sup>c</sup>	2 <sup>d</sup>	50 <sup>b</sup>	85 <sup>a</sup>
Malonil genistina	444 <sup>c</sup>	220 <sup>d</sup>	43 <sup>e</sup>	660 <sup>b</sup>	1.572 <sup>a</sup>
Daidzeína	35,1 <sup>d</sup>	156 <sup>a</sup>	3 <sup>e</sup>	93 <sup>c</sup>	139 <sup>b</sup>
Acetil genistina	389 <sup>c</sup>	50 <sup>b</sup>	4 <sup>d</sup>	42 <sup>b</sup>	147 <sup>a</sup>
Genisteína	31 <sup>c</sup>	171 <sup>a</sup>	3,3 <sup>d</sup>	39 <sup>c</sup>	129 <sup>b</sup>
Total	1.500 <sup>c</sup>	871 <sup>d</sup>	152 <sup>e</sup>	2.589 <sup>b</sup>	5.621 <sup>a</sup>

Resultados expressos como média para n = 3 (número de repetições do processamento). Análises realizadas em triplicata.

Letras iguais na mesma linha indicam que os resultados não são significativamente diferentes para  $\alpha = 0,05$ .

A análise dos dados da Tabela 9 mostra que a concentração de isoflavonas nos CPSs é estatisticamente inferior à da matéria-prima, FSD, o que confirma a perda de isoflavonas no processamento. Percebe-se ainda um grande aumento na concentração de daidzeína e genisteína no CPS obtido por precipitação ácida, em comparação às concentrações dessas agliconas na FSD, indicando que o CPS do processo ácido é um produto mais rico em agliconas que a FSD. O aumento da participação percentual de isoflavonas agliconas no CPSs do processo ácido pode ser visualizado na Figura 21.

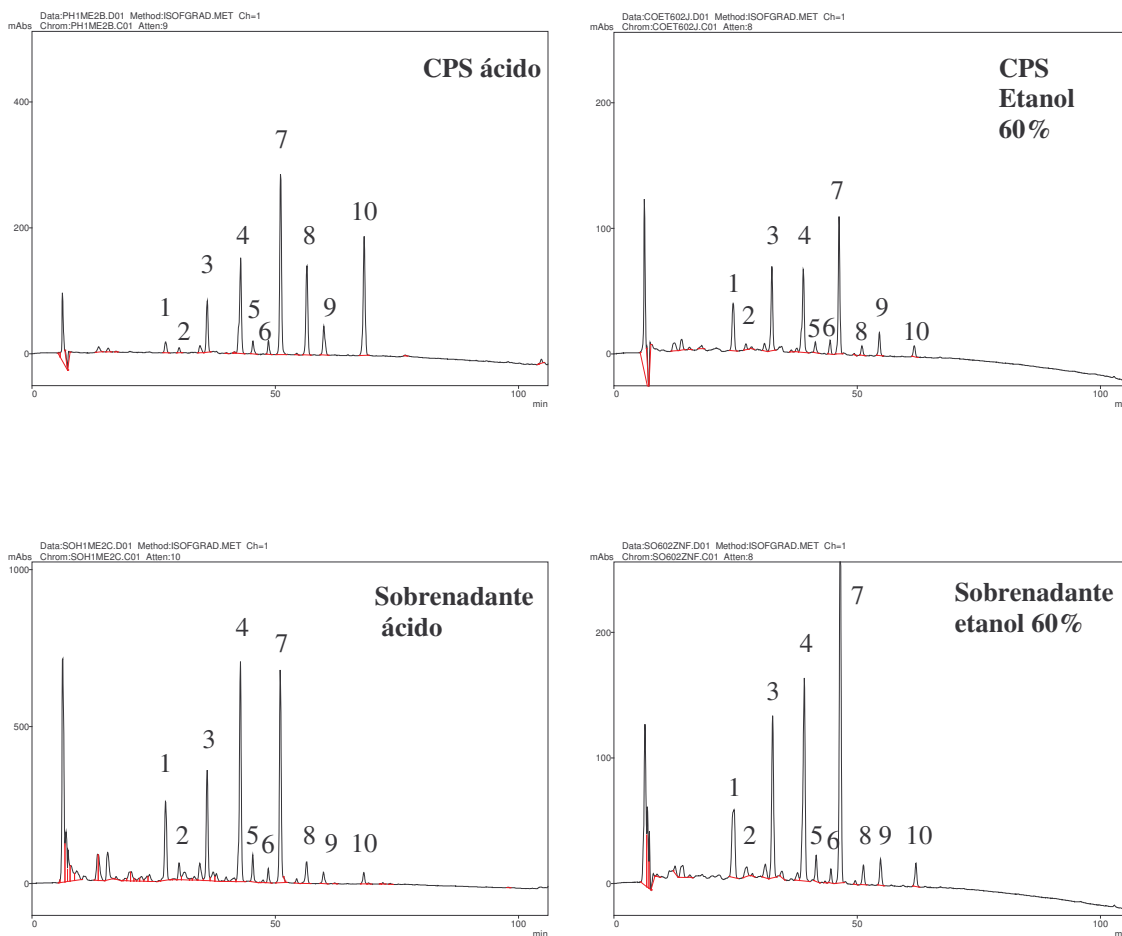


Figura 20: Perfis cromatográficos de isoflavonas nas correntes de processamentos de CPSs em escala laboratorial: comparação entre precipitação ácida a pH 4,5 e com etanol 60% (v/v). Isoflavonas: 1: daidzina; 2: glicitina; 3: genistina; 4: malonil daidzina; 5: malonil glicitina; 6: acetil daidzina, 7: malonil genistina; 8: daidzeína; 9: acetil genistina; 10: genisteína. Condições cromatográficas: coluna YMC PACK ODS-A, S-5  $\mu\text{m}$ , 120  $\text{\AA}$ ; 4,6  $\phi$ - 250 mm. Fluxo de 0,5 mL/min, temperatura da coluna: 30  $^{\circ}\text{C}$ . Solvente A: ácido acético 5% (v/v) em água, solvente B: metanol aquoso 80% (v/v). Gradiente iniciado com 20% de solvente B, passando para 40% em 15 min, subindo a 50 % entre 15 e 55 min, atingindo 80% em 95 min, decrescendo para 20% entre 95 e 105 min. A coluna foi reequilibrada com 20% de B por 15 min entre as corridas. A detecção foi feita pela absorção a 254 nm

Observação: embora as isoflavonas de interesse fossem totalmente eluídas até 75 min, foi mantido o método adotado pelo Laboratório de Bioquímica da FEA-UNICAMP, com corrida até 105 min e mais 15 min de reequilíbrio.



A Figura 21 apresenta a distribuição percentual das isoflavonas nas correntes de processamento de CPSs em escala laboratorial. Verificou-se que o tratamento com etanol 60% (v/v) alterou de forma pouco expressiva o perfil de isoflavonas observado no CPS e no sobrenadante desse processo, havendo predominância das formas malonil glicosídeos. Já o tratamento ácido promoveu redução dos teores das formas malonil glicosídeos, mais acentuadamente para malonil daidzina que para malonil genistina, indicando maior estabilidade desta última, fato que também foi observado por Wang et al. (1998). O percentual de  $\beta$ -glicosídeos do CPS obtido por tratamento com ácido diminuiu em relação ao percentual observado na FSD, e houve grande aumento do percentual das isoflavonas agliconas daidzeína e genisteína, provavelmente por hidrólise no pH ácido de 4,5. Não foram detectadas as formas acetil glicitina e gliciteína em nenhum dos processos estudados. Novamente, verificou-se a predominância das formas malonil conjugadas e  $\beta$ -glicosídeos nos sobrenadantes dos dois processos.



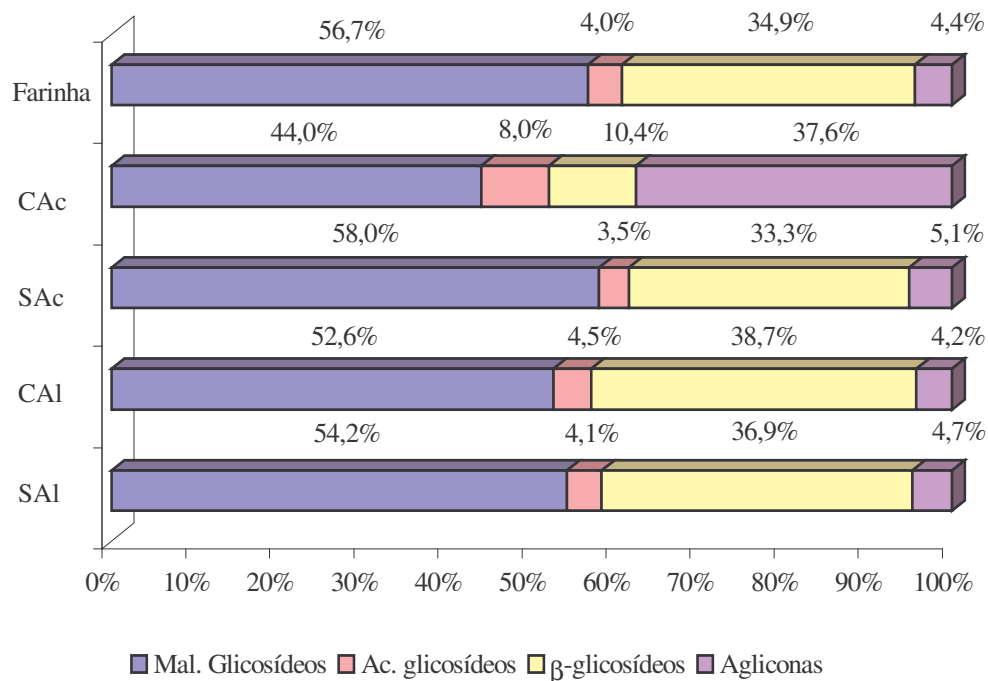


Figura 21: Distribuição percentual das formas de isoflavonas em correntes de processamento de CPSs em escala laboratorial: comparação entre precipitação com solução ácida a pH 4,5 e com etanol 60% (v/v). CAc: CPS do processo ácido; SAc: sobrenadante do processo ácido; CAI: CPS do processo alcoólico SAI: sobrenadante do processo alcoólico; Mal.: malonil; Ac.: acetil.

### 5.3. Comparação entre processamentos em escala laboratorial de CPSs com etanol 40, 50, 60, 70 e 80% (v/v)

#### 5.3.1. Rendimento em peso e em proteína

Foram observados diferentes rendimentos de processo em peso, percentual de proteína em base seca e retenção de proteínas (Tabelas 10 e 11). O rendimento de processo em peso aumentou com a concentração de álcool utilizada, bem como o percentual de retenção de proteína nos CPSs. Não houve diferença significativa ( $\alpha = 0,05$ ) entre o





percentual de proteína em base seca dos produtos obtidos, com exceção do processamento com etanol 80%. O aumento da concentração de álcool na precipitação aumentou o rendimento em peso do CPS final, diminuindo as perdas no sobrenadante. O produto obtido por precipitação com etanol 80% contudo, não atingiu o percentual mínimo de 70% de proteína em base seca, não se adequando ao padrão de qualidade e identidade internacional requerido para CPS, mas atingindo o padrão brasileiro (cujo percentual mínimo de proteína em base seca é de 68 %).

Tabela 10: Comparação entre rendimento e percentual de proteína dos processamentos em escala laboratorial de CPSs com etanol 40, 50, 60, 70 e 80% (v/v).

CPS				
<i>Concentração de etanol no processo % (v/v)</i>	<i>Massa total (g)</i>	<i>Umidade (%)</i>	<i>Rendimento do processo (% p/p)</i>	<i>% proteína (b.s.)</i>
40	34,5 <sup>d</sup>	4,5	69,0 <sup>d</sup>	72,7 <sup>a</sup>
50	35,3 <sup>c</sup>	4,4	70,6 <sup>c</sup>	72,2 <sup>a</sup>
60	35,2 <sup>c</sup>	3,7	70,4 <sup>c</sup>	72,8 <sup>a</sup>
70	36,3 <sup>b</sup>	4,6	72,7 <sup>b</sup>	72,5 <sup>a</sup>
80	38,5 <sup>a</sup>	4,6	77,2 <sup>a</sup>	68,9 <sup>b</sup>

Resultados expressos como média para n = 2 (número de repetições dos processamentos). Análises realizadas em triplicata.

Letras iguais na mesma coluna indicam que os resultados não são significativamente diferentes para  $\alpha = 0,05$ .

Tabela 11: Porcentagem de retenção de proteína nas correntes de processamento em escala laboratorial de CPSs: precipitação com etanol 40, 50, 60, 70 e 80% (v/v)

<i>Concentração de etanol no processo % (v/v)</i>	<i>CPS</i>	<i>Sobrenadante</i>
40	91,8 <sup>d</sup>	7,8 <sup>a</sup>
50	93,6 <sup>c</sup>	4,9 <sup>b</sup>
60	95,4 <sup>b</sup>	3,5 <sup>c</sup>
70	96,5 <sup>ab</sup>	3,1 <sup>d</sup>
80	97,3 <sup>a</sup>	2,7 <sup>d</sup>

Resultados expressos como média para n = 2 (número de repetições dos processamentos). Análises realizadas em triplicata.

Letras iguais na mesma coluna indicam que os resultados não são significativamente diferentes para  $\alpha = 0,05$ .

### 5.3.2. Retenção e perfil de isoflavonas nos CPS dos processamentos com etanol 40, 50, 60, 70 e 80% (v/v).

O percentual de retenção de isoflavonas (em relação ao total contido na matéria-prima inicial, FSD) nos CPSs obtidos por precipitação alcoólica foi baixo, variando de 8,2 a 6,2%. A menor retenção foi verificada no processo com etanol 70% e a maior, para o processo com etanol 40% (Figura 22).

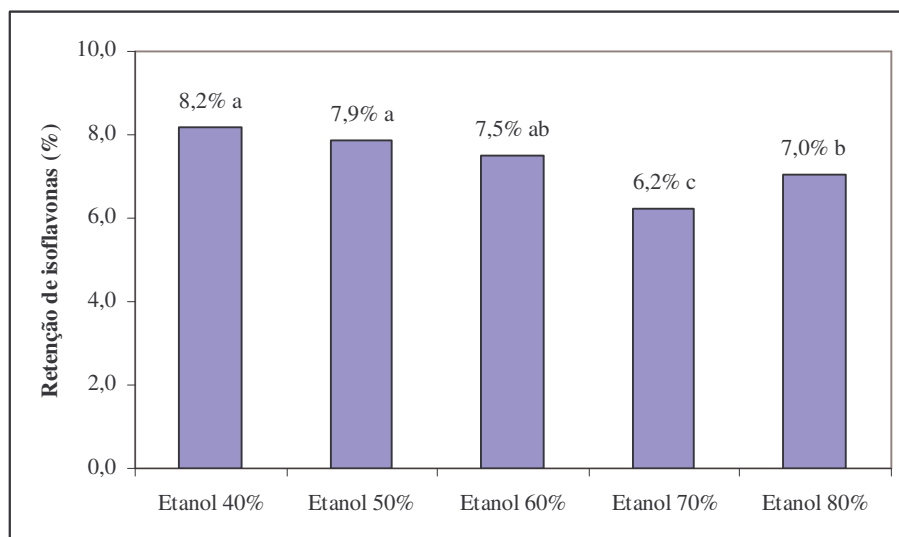


Figura 22: Percentual de retenção de isoflavonas em CPSs obtidos em escala laboratorial por precipitação com etanol 40, 50, 60, 70 e 80% (v/v).

Letras iguais indicam que os resultados não são significativamente diferentes para  $\alpha = 0,05$ .

O perfil de distribuição de isoflavonas nos CPSs apresentou diferenças entre os tratamentos. A concentração das formas malonil glicosídicas aumentou com o aumento da concentração de álcool no meio de extração, enquanto que a concentração das formas acetil glicosídeos,  $\beta$ -glicosídicas e agliconas aumentaram com a diminuição da concentração alcoólica, atingindo valores máximos para o CPS do processo com etanol 40% (Tabela 12 e Figura 23). Esses dados sugerem que mesmo em presença de álcool houve conversão das formas malonil glicosídicas a acetil glicosídeos,  $\beta$ -glicosídeos e agliconas, e que o aumento da polaridade do solvente (causada pelo aumento do percentual de água na mistura) diminuiu a solubilidade das formas agliconas (mais apolares que as demais), aumentando sua concentração no precipitado (CPSs). Esta hipótese é reforçada pelo fato de que o percentual das formas agliconas nos sobrenadantes aumentou com a concentração de álcool, ou seja, quanto menos polar o solvente, maior o percentual de agliconas presentes no sobrenadante (Figura 24).



Tabela 12: Concentração de isoflavonas ( $\mu\text{g/g}$  b.s.) em CPSs obtidos em escala laboratorial por precipitação com etanol 40, 50, 60, 70 e 80% (v/v).

<i>Isoflavona</i>	<i>CPS Etanol 40%</i>	<i>CPS Etanol 50%</i>	<i>CPS Etanol 60%</i>	<i>CPS Etanol 70%</i>	<i>CPS Etanol 80%</i>
Daidzina	28,3 <sup>a</sup>	26,8 <sup>a</sup>	24,1 <sup>b</sup>	19,9 <sup>c</sup>	18,7 <sup>c</sup>
Glicitina	3,2 <sup>a</sup>	2,9 <sup>b</sup>	2,5 <sup>c</sup>	2,0 <sup>d</sup>	1,5 <sup>e</sup>
Genistina	43,2 <sup>a</sup>	37,3 <sup>b</sup>	32,8 <sup>c</sup>	26,3 <sup>d</sup>	25,3 <sup>d</sup>
Malonil daidzina	29,3 <sup>b</sup>	32,9 <sup>a</sup>	33,4 <sup>a</sup>	31,8 <sup>ab</sup>	32,9 <sup>a</sup>
Malonil glicitina	3,5 <sup>a</sup>	3,6 <sup>a</sup>	3,1 <sup>b</sup>	3,3 <sup>ab</sup>	3,2 <sup>b</sup>
Acetil daidzina	3,8 <sup>a</sup>	3,4 <sup>a</sup>	2,4 <sup>b</sup>	2,6 <sup>b</sup>	2,5 <sup>b</sup>
Malonil genistina	39,2 <sup>ab</sup>	42,1 <sup>ab</sup>	43,0 <sup>a</sup>	38,6 <sup>b</sup>	39,8 <sup>ab</sup>
Daidzeína	6,8 <sup>a</sup>	4,6 <sup>b</sup>	3,2 <sup>c</sup>	2,7 <sup>d</sup>	2,5 <sup>d</sup>
Acetil genistina	8,1 <sup>a</sup>	6,3 <sup>b</sup>	4,1 <sup>b</sup>	4,5 <sup>b</sup>	4,5 <sup>c</sup>
Genisteína	7,6 <sup>a</sup>	4,9 <sup>b</sup>	3,2 <sup>c</sup>	2,4 <sup>d</sup>	2,0 <sup>d</sup>
Total	172,9 <sup>a</sup>	164,7 <sup>a</sup>	151,9 <sup>b</sup>	134,1 <sup>c</sup>	133,0 <sup>c</sup>

Resultados expressos como média para  $n = 2$  (número de repetições dos processamentos). Análises realizadas em triplicata.

Letras iguais na mesma linha indicam que os resultados não são significativamente diferentes para  $\alpha = 0,05$ .

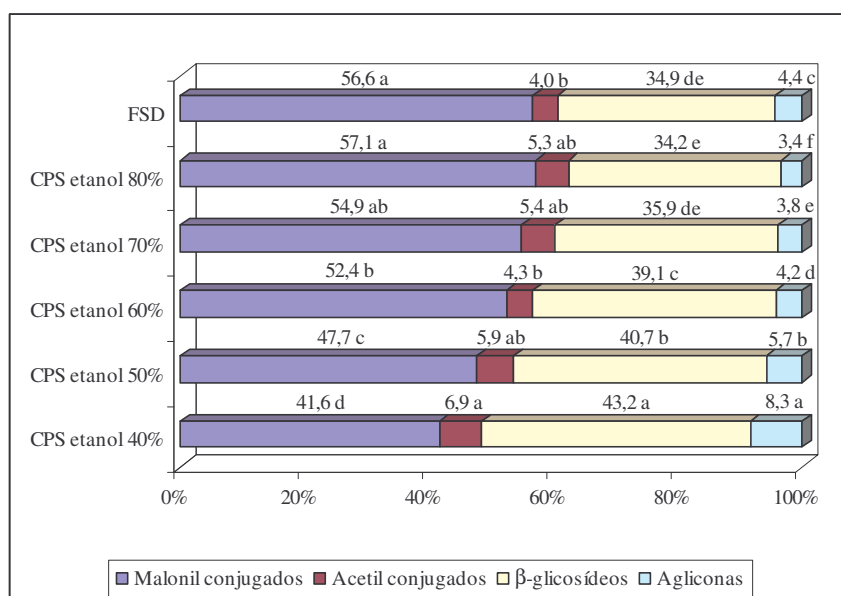


Figura 23: Perfil de distribuição percentual de isoflavonas nos CPSs obtidos em escala laboratorial por precipitação com etanol 40, 50, 60, 70 e 80% (v/v).

Letras iguais na mesma coluna indicam que os resultados não são significativamente diferentes para  $\alpha = 0,05$ .



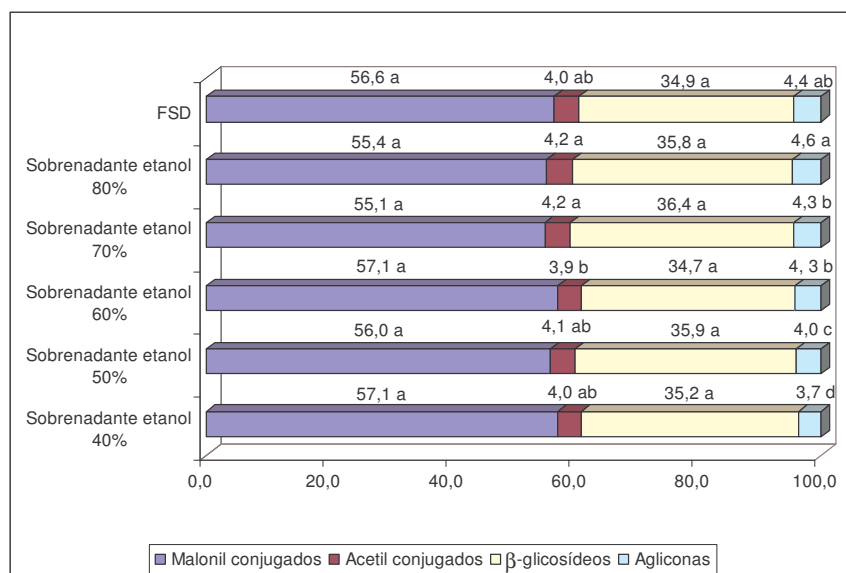


Figura 24: Perfil de distribuição percentual de isoflavonas nos sobrenadantes de processamento em escala laboratorial de CPSs com etanol 40, 50, 60, 70 e 80% (v/v).

Letras iguais na mesma coluna indicam que os resultados não são significativamente diferentes para  $\alpha = 0,05$ .

Não foi possível estabelecer balanços de massa para os processos de precipitação de CPSs com solução alcoólica por questões técnicas. A retirada do álcool dos sobrenadantes dos processos foi testada com uso de rotoevaporador e liofilização. Entretanto, não foi possível destilar o álcool com o rotoevaporador sem aquecer as amostras a temperaturas acima de 60 °C (limite inferior para o qual começa a haver conversão das formas malonil glicosídicas para β-glicosídeos). Quanto à liofilização, a presença de etanol dificultou o processo e a extração das isoflavonas do resíduo sólido obtido, apresentando assim grande variação nos resultados, que se mostraram pouco consistentes. Para contornar a questão, e conseguir ao menos a análise de distribuição de perfil de isoflavonas (Tabela 13), estes sobrenadantes foram somente filtrados em membrana de 0,22 μm antes da aplicação no cromatógrafo. Dessa forma, não foi possível estabelecer o balanço de massa dos processos, pois embora o volume injetado fosse conhecido, não havia como determinar seu equivalente em volume de sobrenadante não filtrado. Ainda assim, com base nessas





concentrações pode-se estabelecer o percentual relativo das formas malonil, acetil e  $\beta$ -glicosídeos e das formas agliconas, como mostrado na Figura 24.

Tabela 13: Concentração de isoflavonas ( $\mu\text{g/mL}$  de sobrenadante filtrado) em sobrenadantes do processamento em escala laboratorial de CPSs com etanol 40, 50, 60, 70 e 80%.

<i>Isoflavona</i>	<i>Sobrenadante Etanol 40%</i>	<i>Sobrenadante Etanol 50%</i>	<i>Sobrenadante Etanol 60%</i>	<i>Sobrenadante Etanol 70%</i>	<i>Sobrenadante Etanol 80%</i>
Daidzina	9,9 <sup>b</sup>	10,4 <sup>a</sup>	10,1 <sup>b</sup>	10,5 <sup>a</sup>	10,3 <sup>a</sup>
Glicitina	1,3 <sup>b</sup>	1,4 <sup>a</sup>	1,3 <sup>ab</sup>	1,3 <sup>ab</sup>	1,1 <sup>c</sup>
Genistina	13,1 <sup>b</sup>	14,0 <sup>a</sup>	13,6 <sup>ab</sup>	13,8 <sup>a</sup>	13,5 <sup>a</sup>
Malonil daidzina	16,7 <sup>a</sup>	17,0 <sup>a</sup>	17,4 <sup>a</sup>	16,2 <sup>a</sup>	16,1 <sup>a</sup>
Malonil glicitina	1,9 <sup>ab</sup>	1,9 <sup>ab</sup>	2,0 <sup>a</sup>	1,7 <sup>c</sup>	1,8 <sup>bc</sup>
Acetil daidzina	1,0 <sup>a</sup>	1,0 <sup>a</sup>	1,0 <sup>a</sup>	1,0 <sup>a</sup>	1,0 <sup>a</sup>
Malonil genistina	20,7 <sup>a</sup>	21,3 <sup>a</sup>	22,0 <sup>a</sup>	20,8 <sup>a</sup>	20,6 <sup>a</sup>
Daidzeína	1,3 <sup>c</sup>	1,5 <sup>b</sup>	1,7 <sup>a</sup>	1,4 <sup>ab</sup>	1,6 <sup>ab</sup>
Acetil genistina	1,7 <sup>b</sup>	1,9 <sup>ab</sup>	1,8 <sup>ab</sup>	2,0 <sup>a</sup>	2,0 <sup>a</sup>
Genisteína	1,2 <sup>c</sup>	1,4 <sup>b</sup>	1,5 <sup>ab</sup>	1,5 <sup>ab</sup>	1,6 <sup>a</sup>
Total	68,8 <sup>b</sup>	71,8 <sup>a</sup>	72,3 <sup>a</sup>	70,4 <sup>a</sup>	69,4 <sup>a</sup>

Letras iguais na mesma coluna indicam que os resultados não são significativamente diferentes para  $\alpha = 0,05$ .

A Tabela 13 mostra que não houve diferença significativa ( $\alpha=0,05$ ) na concentração de isoflavonas totais (em  $\mu\text{g/mL}$  de sobrenadante filtrado) entre os sobrenadantes dos processos, com exceção da precipitação com etanol 40%, menor que as demais. As concentrações das formas malonil daidzina e malonil genistina não foram significativamente diferentes entre os processos, mas houve diferença significativa em relação às concentrações de daidzina, genistina, daidzeína e genisteína: o sobrenadante do processo com etanol 40% apresentou concentrações dessas isoflavonas menor que os demais processos.

#### 5.4. Considerações gerais sobre os processamentos avaliados

Os produtos obtidos apresentaram baixa quantidade de acetil glicosídeos. Durante o processamento industrial, ao contrário do laboratorial, os IPSs ou CPSs são submetidos a altas temperaturas na secagem (*spray-drying* ou *tumble drying*), o que pode promover conversão das formas malonil glicosídeos para acetil conjugadas, uma vez que esta conversão ocorre tipicamente em processos com aplicação de calor seco, tais como forneamento, tostagem e extrusão (Coward et al., 1998; Mahungu et al., 1999).

Gliciteína e acetil gliciteína não foram detectados em nenhuma das amostras analisadas. A maioria dos cultivares brasileiros de soja contém muito pouca ou nenhuma quantidade de gliciteína e conjugados (Aguiar, 2004).

Nota-se ainda que as quantidades não recuperadas de isoflavonas aumentam com o número de etapas do processamento, provavelmente por perdas de material retidos nos equipamentos e vidrarias. As frações não recuperadas correspondem a 17,9% para processamento de isolado protéico, comparável com a fração indeterminada observada por Wang et al. (1998) em processo semelhante, 11,7% para precipitação ácida e apenas 2,6% para precipitação com etanol 60% (v/v). A diferença entre estes dois últimos processos pode ser atribuída à alta solubilidade das isoflavonas em soluções alcoólicas, o que diminui a probabilidade de retenção das isoflavonas em superfícies apolares, como plásticos de tubos de centrífuga, seringas, etc. A hidrólise provocada pela etapa de precipitação com ácido no processamento de IPS e CPS também pode promover degradação parcial de isoflavonas (Genovese e Lajolo, 2001).

Pelos resultados obtidos, verifica-se que os sobrenadantes dos processos contém isoflavonas e proteína, e podem ser estudadas maneiras de promover a recuperação de isoflavonas, ou de diminuir a perda das mesmas nessas correntes de processo. Além disso, tanto os ingredientes protéicos como os efluentes de processo poderiam sofrer tratamentos térmicos e enzimáticos de forma a converter as isoflavonas para as formas agliconas. Seria necessário, no entanto, estudar a influência de tais tratamentos nas características sensoriais

e de funcionalidade tecnológica (retenção de água, capacidade emulsionante, espumante, entre outras) dos ingredientes de soja obtidos.

IPs e CPSs obtidos por precipitação ácida e enriquecidos com isoflavonas poderiam ser usados para veicular isoflavonas na dieta, principalmente para as pessoas que não gostam ou não consomem os produtos convencionais de soja, por meio de sua adição em produtos formulados presentes comumente na dieta normal da população, como bebidas, sorvetes, pães, massas, biscoitos, doces e produtos cárneos. A contribuição dos CPSs obtidos por precipitação com álcool seria muito pequena.

O resíduo alcalino do processamento de IPS, composto principalmente por fibras insolúveis, contém proteínas e isoflavonas. Em nosso estudo, o resíduo apresentou teor de 38% de proteína (b.s.) e concentração de 590 µg/g (b.s.) de isoflavonas, comparável à concentração do produto principal do processo, o IPS (690 µg/g b.s.). Se antes esse subproduto era destinado à ração animal, as empresas processadoras de soja já perceberam esse potencial e iniciaram processos para seu aproveitamento, incorporando esse material em proteínas texturizadas de soja, ou comercializando-o como fibras de soja.



## 6. CONCLUSÕES GERAIS

1. Dentre os três ingredientes protéicos de soja obtidos, o CPS precipitado com ácido foi o produto que apresentou maior quantidade total de isoflavonas (871  $\mu\text{g/g}$  b.s.) e maior teor de isoflavonas agliconas (327  $\mu\text{g/g}$  b.s), que correspondem a 37,6 % do total de isoflavonas presentes nesse produto.
2. O processamento pode afetar significativamente a quantidade total e o perfil de distribuição das isoflavonas em suas formas conjugadas (malonil, acetil e  $\beta$ -glicosídeos) e agliconas. Tratamentos com ácido promovem hidrólise, aumentando o teor das isoflavonas agliconas. As maiores perdas de isoflavonas nos processos estudados ocorrem nos sobrenadantes: mais de 90% para precipitação de CPS com soluções etanólicas; 52% para o processo de obtenção de IPS e 47% para o processo de precipitação ácida de CPS.
3. Nos processos com precipitação alcoólica, a menor retenção de isoflavonas foi observada no CPS do processo de precipitação etanol 70% (6,2%) e a maior (mas ainda pequena, se comparada ao CPS da precipitação ácida) foi observada no CPS do processo com etanol 40%. O aumento da polaridade do solvente, obtida por redução da proporção de álcool promoveu diminuição das formas malonil glicosídeos e aumento das demais formas.
4. O processamento de CPS com álcool aumentou o rendimento em peso e em retenção de proteína em comparação ao processo com solução ácida. O máximo de rendimento em peso e proteína foi obtido no processo com etanol 80%, que, entretanto, resultou no produto com menor concentração de isoflavonas (133  $\mu\text{g/g}$  b.s.).



## 7. SUGESTÕES PARA FUTUROS TRABALHOS

1. Aplicar tratamento térmico e enzimas  $\beta$ -glicosidases durante o processamento de IPS ou CPS (precipitação ácida) visando aumentar o teor de isoflavonas agliconas.
2. Avaliar as características sensoriais e propriedades tecnológicas dos ingredientes de soja obtidos.
3. Estudar meios para recuperação de isoflavonas e proteínas dos efluentes dos processos atuais.
4. Avaliar modificações nas condições de processamento para diminuir a perda de isoflavonas nos sobrenadantes.
5. Avaliar processamento de outros produtos de soja, como por exemplo, proteína texturizada, tofu, kinako (farinha de soja torrada) e extrato hidrossolúvel de soja (conhecido como leite de soja).





## 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACCAME, M. E. C. Las isoflavonas: utilidades y necesidades del control farmacêutico. *Panorama Actual Medico*, 25 (244): 564-567, 2001.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução ANVISA RDC nº 39, de 21 de março de 2001. Publicada no DOU de 22/03/2001. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=174#>>. Acesso em 19 nov. 2004.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Resolução ANVISA RDC nº 360, de 23 de dezembro de 2003. Publicada no DOU de 26/12/2003. Disponível em: <<http://e-legis.bvs.br/leisref/public/showAct.php?id=9059>>. Acesso em 19 nov. 2004.

AOAC – Association of Official Analytical Chemists. *Official Methods of Analysis*, 16<sup>a</sup>.ed., Washington D. C., Horwtis, W. (ed), 1997.

ADLERCREUTZ, H.; HAMALAINEN, E.; GORBAH, S; GOLDIN, B. Dietary phytoestrogens and the menopause in Japan. *Lancet*, 337: 1270-1272, 1991.

ADLERCREUTZ, H.; MARKKANEN, H.; WATANABE, S. Plasma concentrations of phytoestrogens in Japanese men. *Lancet*, 342: 1209-1210, 1993.

AGNOL, A. D. Current status of soybean production and utilization in Brazil. In: VII World Soybean Research Conference, IV International Soybean Research Conference, III Congresso Brasileiro de Soja, Foz do Iguaçu, 01-05 mar. 2004. *Proceedings*. Londrina: Embrapa Soybean, 2004. p. 10-18.

AGUIAR, C. L. *Transformações física e bioquímica de isoflavonas conjugadas de soja (Glycine max L.) e o efeito na atividade biológica in vitro*. Campinas, 2004, 286 p. Tese (Doutor em Ciências de Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

AKIYAMA, T.; ISHIDA, J.; NAKAGAWA, S.; OGAWARA, H.; WATANABE, S.; ITOH, N. M.; SHIBUYA, M.; FUKAMI, Y. Genistein, a specific inhibitor of tyrosine-specific protein kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 262: 5592-5595, 1987.

ANDERSON, J.W.; JOHNSTONE, B. M.; COOK-NEWELL, M.E. Meta-analysis of the effects of soy protein intake in serum lipids. *New England Journal of Medicine*, 333: 276-282, 1995.

ANTHONY, M. S.; CLARKSON, T. B.; BULLOCK, B. C. Soy protein versus soy phytoestrogens in the prevention of diet-induced coronary artery atherosclerosis of male cynomolgus monkeys. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, 17 (11): 2524-31, 1997.

ARAÚJO, J. M. A.; CARLOS, J. C. S.; SEDYAMA, C. S. Isoflavonas em grãos de soja: importância da atividade de  $\beta$ -glicosidase na formação de sabor amargo e adstringente. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 17 (2): 137-141, 1997.

ARJMANDI, B. H.; SMITH, B. J. Soy isoflavones osteoprotective role in postmenopausal women: mechanism of action. *Journal of Nutritional Biochemistry*, 13: 130-137, 2002.

BARNES, S. Effect of genistein on *in vitro* and *in vivo* models of cancer. *Journal of Nutrition*, 125: 777S-783S, 1995.

BARNES, S.; KIRK, L.; COWARD, J. Isoflavones and their conjugates in soy foods: extraction conditions and analysis by HPLC-Mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 2466-2474, 1994.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A. Pigmentos naturais. In. \_\_\_\_\_ & \_\_\_\_\_. *Introdução à Química de Alimentos*. 2<sup>a</sup> ed. São Paulo. Ed. Varela, 1995. Cap. 7, p. 191-223.

BERK, Z. Protein isolate. In. \_\_\_\_\_. *Technology of edible flours and protein products from soybean* (3<sup>a</sup> ed). Roma, FAO (United Nations). Chap. 6, p. 112-124, 1979. (FAO Agricultural Service Bulletin no. 11).

BERK, Z. Isolated Soybean Protein (ISP). In. \_\_\_\_\_. *Technology of edible flours and protein products from soybean* (5<sup>a</sup> ed). Roma, FAO (United Nations). Chap. 6, 1992. FAO Agricultural Service Bulletin No. 97). Disponível em: <[www.fao.org/docrep/t0532e/t0532e07.htm](http://www.fao.org/docrep/t0532e/t0532e07.htm)>. Acesso em 03 mar. 2001.

BURKE, G. L. The potential use of a dietary soy supplement as a post-menopausal hormone replacement therapy. In: *The Abstracts of the 2<sup>nd</sup> International Symposium on the Role of Soy in Preventing and Treating Chronic Disease*. Brussels, Belgium, 15-18 Sept., 1996. p.40.

CAMPBELL, M. F. In ATSCHUL, A. M.; WILCKE, H. L. ED. *New protein Foods*, vol. 5, New York, Academic Press, 1985, p. 301-307.

CARRÃO-PANIZZI, M.; KITAMURA, K. Isoflavone content in Brazilian soybeans cultivars. *Breeding Science*, 45 (3): 295-300, 1995.

CARROL, K. K. Review of clinical studies on cholesterol-lowering response to soy protein. *Journal of the American Dietetic Association*, 91: 820-827, 1991.

CASSIDY, A.; BINGHAM, S.; SETCHELL, K. D.R. Biological effects of a diet of soy protein rich in isoflavones on the menstrual cycle of premenopausal women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 60 (3): 333-340, 1994.

CHOI, J. S. C.; KWON, T. W.; KIM, J. S. Isoflavone contents in some varieties of soybean. *Foods and Biotechnology*, 5 (2), 167-169, 1996.

CIRCLE, S. J.; SMITH, A. K. Processing flours, concentrates and isolates. In. SMITH, A.K.; CIRCLE, S. J. (Eds). *Soybeans: Chemistry and Technology* (Vol. 1 – Proteins). AVI Publishing Company Inc, 1972. Chap. 9, p. 294-338.

CLINE, J. M. Effects of dietary soy on the uterus and breast of macaques.. In: *The Abstracts of the 3<sup>rd</sup> International Symposium on the Role of Soy in preventing and Treating Chronicle Disease*. Washington, EUA, 31 Oct. – 03 Nov., 1999. Disponível em: [www.soyfoods.com/3rdSoySymp/EffectsOfDietary.html](http://www.soyfoods.com/3rdSoySymp/EffectsOfDietary.html)>. Acesso em 12 mar. 2003.

COMISSÃO NACIONAL DE NORMAS E PADRÕES PARA ALIMENTOS. Resolução CNNPA nº 14 , de 28 de junho de 1978. Publicada noDOU de 28/06/1978. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/14\\_78.htm](http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/14_78.htm)>. Acesso em 15 nov. 2003.

COWARD, L.; BARNES, N. C.; SETCHELL, K. D.R.; BARNES, S. Genistein, daidzein and their  $\beta$ -glucoside conjugates: Antitumor isoflavones in soybean foods from American and Asian diets. *Journal of Agricultural Chemistry*, 41 (11): 1961-1967, 1993.

COWARD, L.; SMITH, M.; KIRK, M.; BARNES, S. Chemical modification of isoflavones in soy foods during cooking and processing. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68 (suppl.): 1486S-1491S, 1998.

DALAIS, F. S.; RICE, G. E.; BELL, R. J.; MURKIES, A. L.; MEDLEY, G.; STAUSS; B. J. G.; WAHLQUIST, M. L. Dietary soy supplementation increases vaginal cytology maturation index and bone mineral content in postmenopausal women. In: *The Abstracts of the 2<sup>nd</sup> International Symposium on the Role of Soy in Preventing and Treating Chronicle Disease*. Brussels, Belgium, 15-18 Sept., 1996. p. 44.

DALAIS, F. S.; RICE, G. E.; BELL, R. J. Dietary soy supplementation increases vaginal cytology maturation index and bone mineral content in postmenopausal women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68 (suppl.): 1518S, 1998.

EDWARD, J. O Brasil que planta e colhe dinheiro. *Revista Veja – Edição Especial Agronegócio*. São Paulo, abril de 2004, p. 14-21.

ELDRIDGE, A. C. Determination of isoflavones in soybean flours, protein concentrates and isolates. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30, 353-355, 1982.

ELDRIDGE, A. C.; KWOLEK, W. F. Soybean isoflavones: effect of environment and variety composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 31: 394-396, 1983.

ERDMAN, J. JR; STILLMAN, R. J.; LEE, K. F.; POTTER, S. M. Short term effects of soybean isoflavones on bone in postmenopausal women. Poster presentation: *The Abstracts of the 2<sup>nd</sup> International Symposium on the Role of Soy in Preventing and Treating Chronic Disease*. Brussels, Belgium, 15-18 Sept., 1996. Disponível em: <[www.soyfoods.com/symposium/oa3\\_5.html](http://www.soyfoods.com/symposium/oa3_5.html)>. Acesso em 12 mar. 2003.

ESAKI, H. KAWAKISHI, S.; MORIMITSU, Y.; OSAWA, T. New potent antioxidative o-dihydroxyisoflavones in fermented Japanese soybean products. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 63 (9): 1637-1639, 1999.

FANTI, P; FAUGER, M. C.; GANG, Z.; SCHMIDT, J.; COHEN, D.; MALLUCHE, H.H. Systematic administration of genistein partially prevents bone loss in ovariectomized rats in a non-estrogenic-like mechanism. In: *The Abstracts of the 2<sup>nd</sup> International Symposium on the Role of Soy in Preventing and Treating Chronic Disease*. Brussels, Belgium, 15-18 Sept., 1996. p. 20.

FARMAKALIDIS, E.; MURPHY, P. Isolation of 6"-O-acetylgenistin e 6"-O-acetylidaizín from toasted defatted soy flakes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 33: 385-389, 1985.

FDA - Food and Drug Administration, Health and Human Service. Boning Up on Osteoporosis. *FDA Consumer Magazine*, 30 (7), 1996. Disponível em: <[www.fda.gov/fdac/features/796\\_bone.html](http://www.fda.gov/fdac/features/796_bone.html)>. Acesso em 22 jul. /2004.

FDA - Food and Drug Administration, Health and Human Service. Food labeling: health claims: soy protein and coronary heart disease: final rule. *Federal Registration*, 64: 55700-55733, 1999.

FDA – Food and Drug Administration – *Talk paper*: FDA approves new health claim for soy protein and coronary heart disease, 1999. Disponível em:

<[www.cfsan.fda.gpv/~ird/tpsoyptl.htm](http://www.cfsan.fda.gpv/~ird/tpsoyptl.htm)>. Acesso em 10 out. 2003.

FDA – Food and Drug Administration – Center for Devices and Radiological Health. *Code of Federal Regulations*, 21 CFR 320.1. , 2003. Disponível em:

<<http://www.accessdata.fda.gov/scripts/cdrh/cfdocs/cfcfr/CFRSearch.cfm?FR=320.1>>.

Acesso em 16 jul. /2004.

FRANKE, A., A.; CUSTER, L. J.; CERNA, C. M.; NARALA, K. Rapid HPLC analysis for dietary phytoestrogens from legumes and from human urine. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 208: 18-26, 1995.

GALLAGHER, J. C. Effect of soy protein on bone metabolism. In: *The Abstracts of the Third international Symposium on the Role of Soy in Preventing and Treating Chronic Disease*. Washington D.C.; 31 Oct. – 3 Nov. , 1999. Disponível em:

<[www.soyfoods.com/3rdSoySymp/EffectOfSoyProteinOn.html](http://www.soyfoods.com/3rdSoySymp/EffectOfSoyProteinOn.html)>. Consulta em 05 fev. 2003.

GENOVESE, M. I. ; LAJOLO, F. M. Determinação de isoflavonas em derivados de soja. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 21 (1): 86 -93, jan-abr, 2001.

GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F. M. Isoflavones in soy-based foods consumed in Brazil: Levels, Distribution , and Estimated intake. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50: 5987-5993, 2002.

GHOSH, P.; FENNER, G. P. Improved method for gas chromatography analysis of genistein and daidzein from soybean (*Glycine max*) seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47 (9): 3455-3456, 1999.

GRIFFITH, A. P.; COLLISON, M. W. Improved methods for the extraction and analysis of isoflavones from soy-containing foods and nutritional supplements by reversed-phase high-performance liquid chromatography and liquid-chromatography-mass spectrometry. *Journal of Chromatography A*, 913: 397-413, 2001.

HAN, K. Y., YIM, D. K.; BACARAT, E. C.; GIRÃO, M. J. B. C.; PANIZZI, M. C. Efeito de isoflavonóide na síndrome do climatério. In: *Anais do Simpósio: Alimentos funcionais para novo milênio: Qualidade de vida e Saúde*, Campinas, 22-23 ago., 2000, p. 11.

HARDING, C.; MORTAN, M. GOULD, V.; Mc MICHAEL-PHILLIPS, D.; HOWELL,; BUNDRED, N.J. Dietary soy supplementation is oestrogenic in menopausal women. In: *The Abstracts of the 2<sup>nd</sup> International Symposium on the Role of Soy in preventing and Treating Chronic Disease*, Brussels, Belgium, 15-18 Sept., 1996. p. 46.

HEINONEN, S.; WÄHÄLA, K.; ADLERCREUTZ, H. Identification of isoflavone metabolites dihidroxidaidzein, dihidroxigenistein, 6'-OH-O-dma, and cis-4-OH-equol in human urine by gas chromatography-mass spectroscopy using authentic reference compounds. *Analytical Biochemistry*, 271: 211-219, 1999.

HEINONEN, S.; WÄHÄLA, K.; ADLERCREUTZ, H. Metabolites of dietary phytoestrogens daidzein, genistein and glycitein. *Journal of Nutrition*, 130 (suppl.): 683S, 2000.

HETTIARACHCHY, N. ; KALAPATHY, U. Soybean protein products. In. : LIU, K. *Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization*. 2<sup>a</sup> ed. Gaithersburg, Aspen Publishers. 1999. Chap. 8, p. 379-411.

HOECK, J. A.; FEHR, W. R.; MUHRPHY, P. A.; WELKE, G. A. Influence of genotype and environment on isoflavone contents of soybean. *Crop Science*, 40: 48-51, 2000.

IZUMI, T.; PISUKULA, M. K.; OSAWA, S.; OBATA, A.; TOBE, K.; SAITO, M.; KATAOKA, S.; KUBOTA, Y.; KIKUCHI, M. Soy isoflavone aglycones are absorbed faster and in higher amounts than glucosides in humans. *Journal of Nutrition*, 130: 1695-1699, 2000.

JEFFERY, E. H. Soy isoflavones may enhance bone density in ovariectomized rats. In: *The Abstracts of the Third international Symposium on the Role of Soy in Preventing and Treating Chronic Disease*. Washington D.C.; 31 Oct – 3 Nov., 1999. Disponível em: <[www.soyfoods.com/3rdSoySymp/SoyIsoflavones.html](http://www.soyfoods.com/3rdSoySymp/SoyIsoflavones.html)>. Acesso em 05 abr. 2003.

JOANNOU, G. E.; KELLY, G.E.; REEDER, A. Y.; WARING, M.; NELSON, C.A. A urinary profile study of dietary phytoestrogens: the identification and mode of metabolism of new isoflavonoids. *Journal of Stereoid Biochemistry and Molecular Biology*, 54: 167-184, 1995.

KERCHKOFFS, D. A. J. M.; BROUNS, F.; HORNSTRA, G.; MENSINK, R. P. Effects on the human serum lipoprotein profile of  $\beta$ -glucan, soy protein and isoflavones, plant sterols and stanols, garlic and tocotrienols. *Journal of Nutrition*, 132: 2494-2505, 2002.

KIM, H.; PETERSON T. G.; BARNES, S. Mechanism of action of the soy isoflavone genistein: emerging role for its effects via transforming growth factor signaling pathways. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68 (suppl.): 1418S-1425S, 1998.

KOO, H.; ROSALEN, P.L.; CURY, J.A.; AMBROSANO, G.M.B.; MURATA, R.M.; YATSUDA, R.; IKEGAKI, M.; ALENCAR, S.M.; PARK, Y. K. Effect of a new variety of *Apis mellifera* propolis on mutans streptococci. *Current Microbiology*, v. 41 (3): 192-196, 2000.



KRITCHEVSKY, D. Influence of specific aminoacids on experimental atherosclerosis in rabbits. In: *Third international Symposium on the Role of Soy in Preventing and Treating Chronic Disease*. Washington D.C.; 31 Oct. – 3 Nov, 1999. Disponível em: <[www.soyfoods.com/3rdSoySymp/Influence.html](http://www.soyfoods.com/3rdSoySymp/Influence.html)>. Acesso em 02 abr. 2003.

KUDOU, S.; SHIMOYAMADA, M.; ISHIDA, K.; KAWAMURA, H.; SUGIMURA, T.; WAKABAYASHI, K. A new isoflavone glycoside in soybean seeds (*Glycine max* Merrill), glycitein 7-O- $\beta$ -D-(6''-O-acetyl)-glucopiranoside. *Agricultural and Biological Chemistry*, 55 (3): 859-860, 1991 a.

KUDOU, S.; FLEURY, Y.; WELTI, D.; MAGNOLATO, D. UCHIDA, T. ; KITAMURA, K. ; OKUBO, K. Malonyl isoflavone glycosides in soybean seeds (*Glycine max* MERRIL). *Agricultural and Biological Chemistry*, 55 (9): 2227-2233, 1991 b.

KUIPER, G. G. J. M.; LEMMEN, J. G.; CARLSSON, B.; CORTON J. C.; SAFE, S. H.; VAN der SAAG, P. T.; VAN der BURG, B.; GUSTAFSSON, J-A. Interaction of Estrogenic Chemicals and Phytoestrogens with Estrogen Receptor  $\beta$ . *Endocrinology*, 139 (10): 4252-4263, 1998.

KULLING, S. E.; HONIG, D. M.; METZLER, M. Oxidative metabolism of the soy isoflavones daidzein and genistein in humans *in vitro* and *in vivo*. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 489: 3024-3033, 2001.

LAUDANNA, E. Does soya alleviate hot flushes? In: VII World Soybean Research Conference, IV International Soybean Research Conference, III Congresso Brasileiro de Soja, Foz do Iguaçu, 01-05 mar. 2004. *Proceedings*. Londrina, Embrapa Soybean, 2004. p. 1184-1190

LIGGINS, J.; BLUCK, L.J.C.; COWARD, W. A.; BINGHAM, S. A. Extraction and quantification of daidzein and genistein in food. *Analytical Biochemistry*, 264: 1 – 7, 1998.

LICHTENSTEIN, A. H. Soy protein, isoflavones and cardiovascular disease risk. *Journal of Nutrition*, 128: 1589-1592, 1998.

LIU, K. Chemistry and nutritional value of soybeans components. In. \_\_\_\_\_. *Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization*. 2<sup>a</sup> ed. Gaithersburg, Aspen Publishers, 1999. Chap. 2, p. 25-95.

LU, L-J.; ANDERSON, K. E. Sex and long-term soy diets affect the metabolism and excretion of soy isoflavones in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68 (suppl.): 1500-1504S, 1998.

MAHUNGU, S. M.; DIAS-MERCADO, S.; LI, J.; SCHWENK, M.; SINGLETARY, K.; FALLER, J. Stability of isoflavones during extrusion processing of corn/soy mixture. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47: 279-284, 1999.

MATSUDA, S.; NORIMOTO, F.; MATSUMOTO, Y.; OHBA, R.; TERAMOTO, Y.; OHTA, N.; UEDA, S. Solubilization of a novel isoflavone glycoside-hydrolyzing  $\beta$ -glucosidase from *Lactobacillus casei* subsp. *Rhamnosus* IFO 3425. *Journal of Fermentation Bioengineering*, 77 (4): 439-441, 1994.

MATSUURA, S.; OBATA, A.  $\beta$ -glycosidases from soybean hydrolyze daidzin and genistin. *Journal of Food Science*, 58 (1): 144-147, 1993.

MATSUURA, M. SASAKI, J. ; MURAO, S. Studies on  $\beta$ -glucosidases from soybeans that hydrolyze daidzin and genistin: isolation and characterization of an isozyme. *Bioscience, Biotechnology, Biochemistry*, 59 (9): 11623-1627, 1995.

MERKER, H. M.; BEECHER, G. R. Measurement of food flavonoids by high-performance liquid chromatography: a review. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48 (3): 577-598, 2000.

MESSINA, M. J.; BARNES, S. The role of soy products in reducing the risk of cancer. *Journal of National Cancer Institute*, 83: 541-543, 1991.

MESSINA, M.J.; PERSKY, V.; SETCHELL, K. D.; BARNES, S. Soy intake and cancer risk: a review of the *in vitro* e *in vivo* data. *Nutrition and Cancer*, 21(2): 113-131, 1994.

MESSINA, M. J. Soyfoods: their role in disease prevention and treatment. In: LIU, K. *Soybeans: Chemistry, Technology and Utilization*. 2<sup>a</sup> ed. Gaithersburg, Aspen Publishers, 1999. Chap. 10, p. 443-477.

MESSINA, M. Soyfoods and soybean phyto-oestrogens (isoflavones) as possible alternatives to hormone replacement therapy (HRT). *European Journal of Cancer*, 36: S71 – S77, 2000.

MESSINA, M. The science behind soyafoods. In: VII World Soybean Research Conference, IV International Soybean Research Conference, III Congresso Brasileiro de Soja, Foz do Iguaçu, 01-05 mar.2004. *Proceedings*. Londrina, Embrapa Soybean, 2004 a, p. 73-82.

MESSINA, M. Provisional soya intake recommendations. In: VII World Soybean Research Conference, IV International Soybean Research Conference, III Congresso Brasileiro de Soja, Foz do Iguaçu, 01-05 mar. 2004. *Proceedings*. Londrina, Embrapa Soybean, 2004 b, p. 1055-1061.

MESSINA, M.; HUGHES, C. Efficacy of soyfoods and soybean isoflavone supplements for alleviating menopausal symptoms is positively related to initial hot flush frequency. *Journal of Medicinal Food*, 6(1): 1-11, 2003.

MOLTENI, A.; BRISIO-MOLTENE, L.; PERSKY, V. *In vitro* hormonal effects of soybean isoflavones. *Journal of Nutrition*, 125: 751S-756S, 1995.

MUNRO, I. C.; HLYWKA, J. J.; STEPHEN, A. M.; DOULL, J.; FLAMM, G.; ADLERCREUTZ, H. Soy isoflavones: a safety review. *Nutrition Reviews*, 61 (1): 1-33, 2003.

MURPHY, P. A. Phytoestrogen content of processed soybean products. *Food Technology*, 36 (1): 60-64, 1982.

MURPHY, P. A.; SONG, T.; BUSEMAN, G.; BARUA, K.; BEECHER, G. R.; TRAINER, D.; HOLDEN, J. Isoflavones in retail and institutional foods. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 47: 2697-2704, 1999.

NAIM, M.; GESTETNER, B.; ZILKAH, S.; BIRK, Y.; BONDI, A. Soybean isoflavones: Characterization, determination and antifungal activity. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 22 (5): 806-810, 1974.

NAIM, M.; GESTETNER, B.; BONDI, A.; BIRK, Y. Antioxidative and antihemolytic activities of soybean isoflavones. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 24: 1174-1177, 1976.

NCI – National Cancer Institute – EUA. Understanding estrogen receptors, tamoxifen and raloxifen, 2002. Disponível em:  
<[www.press2.nci.nih.gov/sciencebehind/estrogen/estrogen25.htm](http://www.press2.nci.nih.gov/sciencebehind/estrogen/estrogen25.htm)>. Consulta em 21 set. 2003.

NHI – National Health Institute – EUA. *Osteoporosis Overview*, 2004. Disponível em  
<[www.osteoporosis.org](http://www.osteoporosis.org)>. Consulta em 22/07/2004.

OSTEOPOROSE.MED. *Osteoporose: prevenção e tratamento*. Disponível em:  
<[www.osteoporose.med.br](http://www.osteoporose.med.br)>. Consulta em 22/07/2004.

PANDJAITAN, N.; HETTIARACHCHY, N.; JU, Z.Y.; CRANDALL, P.; SNELLER, C. ; DOMBEK, D. Evaluation of genistin and genistein contents in soybean varieties and soy protein concentrate prepared with 3 basic methods. *Journal of Food Science*, 65 (3): 399-402, 2000.

PARK, Y. K. P.; AGUIAR, C. L.; ALENCAR S. M. ; MASCARENHAS, H. A. A.; SCAMPARINI, A. R. P. Conversão de malonil-b-glicosil isoflavonas em isoflavonas glicosadas presentes em alguns cultivares de soja brasileira. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 22 (2): 130–135, 2002 a.

PARK. Y. K. P. ; ALENCAR, S. M.; NERY, I. A.; AGUIAR, C. L.; PACHECO, T. A.R.C. Enrichment of isoflavones aglycones in extracted soybeans isoflavones by heat and fungal b-glicosidase. *Food Science Industry*, 34: 14-19, 2002 b.

PARK, Y. K. P.; LUI, M. C. Y.; AGUIAR, C. L. Production of enriched isoflavone aglycones during processing of soy protein isolates and soy protein concentrates (Oral presentation). In: *2003 IFT Annual Meeting Book of Abstracts*; 12-16 Jul. 2003, Chicago, Illinois. Chicago, Illinois: Institute of Food Technologists, 2003. p. 215.

PETERSON, G. Evaluation of the biochemical targets of genistein in tumor cells. *Journal of Nutrition*, 125 (suppl.): 784-S-789S, 1995.

POTTER, S. M.; BAUNG, J. A. TENG, H.; STILLMAN, R. J.; SHAY, N. F.; ERDWAN, J. W. Soy protein and isoflavones: their effects on blood lipids and bone density in postmenopausal women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68 (suppl.): 1375S-1379S, 1998.

RICHELLE, M.; PRIDMORE-MERTEN, S.; BODENSTAB, S.; ENSLEN, M.; OFOORD, E. A. Hydrolysis of isoflavone glycosides to algycones by b-glicosidase does not alter plasma and urine isoflavone phamacokinetics in postmenopausal women. *Journal of Nutrition*, 132: 2587-2592, 2002.

SEO, A.; MORR, C. V. Improved high-performance liquid chromatographic analysis of phenolic acids and isoflavonoids from soybean protein products. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 32, p. 530-533, 1984.

SETCHELL, K.D.R. Absorption and metabolism of soy isoflavones – from food to dietary supplements and adults to infants. *Journal of Nutrition*, 130: 654-655 S, 2000.

SETCHELL, K.D.R Soy isoflavones-Benefits and Risk from Nature's Selective Estrogen Receptor Modulators (SERMs). *Journal of the American College of Nutrition*, 20 (5): 354S-362S, 2001.

SETCHELL, K.D. R.; CASSIDY, A. Dietary isoflavons: biological effects and relevance to human health. *Journal of Nutrition*, 129: 758S-767S, 1999.

SETCHELL, K. D.R.; BROWN, N. M.; ZIMMER-NECHEMIAS, L.; BRASHEAR, W. T.; WOLFE, B. E.; KIRSCHNER, A. S.; HEUBI, J. E. Evidence for lack of absorption of soy isoflavone glycosides in humans, supporting the crucial role of intestinal metabolism for bioavailability. *American Journal of Clinical Nutrition*, 76: 447-453, 2002 a.

SETCHELL, K.D.R; BROWN, N. M.; LYDEKING-OLSEN, E. The clinical importance of the metabolite equol – a clue to the effectiveness of soy and its isoflavones. *Journal of Nutrition*, 132: 3577-3584, 2002 b.

SETCHELL, K. D. R.; BROWN, N. M.; DESAI, P. B.; ZIMMER-NECHIMIAS, L.; WOLFE, B.; JAKATE, A. S.; CREUTZINGER, V.; HEUBI, J. E. Bioavailability, disposition, and dose-response effects of soy isoflavones when consumed by healthy women at physiologically typical dietary intakes. *Journal of Nutrition*, 133: 1027-1035, 2003.

SLAVIN, J. L. KARR, S. C. HUTCHINS, A. M.; LAMPE, J. W. Influence of soybean processing, habitual diet, and soy dose on urinary isoflavonoid excretion. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68 (suplemento): 1492S-1495S, 1998.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE OSTEOPOROSE Congresso Mundial de Osteoporose 2004. *Boletim da Sociedade Brasileira de Osteoporose*, v. 15, ago. 2004. Disponível em: <[www.sobrao.com.br](http://www.sobrao.com.br)>. Acesso em 12 nov. 2004.

ST. CLAIR, R. Cardiovascular effects of soybean phytoestrogens. *The American Journal of Cardiology*, 82 (10A): 40-42S, 1998.

SONG, T.; BARUA, K.; BUSEMAN, G. ; MURPHY, P. A. Soy isoflavone analysis: quality control and a new internal standard. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68 (suppl.): 1474S-1479S, 1998.

TSUKAMOTO, C.; SHIMADA, S.; IGITA, K.; KUDOU, S.; KOKUBUN, M.; OKUBO, K. ; KITAMURA, K. Factors affecting isoflavone content in soybean seeds: changes in isoflavones, saponins, and composition of fatty acids at different temperatures during seed development. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 43: 1184-1192, 1995.

UESUGI, T.; FUKUI, Y.; YAMORI, Y. Beneficial effects of soybean isoflavone supplementation on bone metabolism and serum lipids in postmenopausal Japanese women: a four week-study. *Journal of the American College of Nutrition*, 21 (6): 97-102, 2002.

UEHARA, M.; OHTA, A.; SAKAI, K.; SUZUKI, K.; WATANABE, S.; ADLERCREUTZ, H. Dietary fructooligosaccharides modify intestinal bioavailability of a single dose of genistein and daidzein and affect their urinary excretion and kinetic in blood of rats. *Journal of Nutrition*, 131: 787-795, 2001.

USDA – Unites States Department of Agriculture. Iowa State University Database on the isoflavone content of foods, 1999. Disponível em [www.warp.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/isoflav/isfl\\_tbl.pdf](http://www.warp.usda.gov/fnic/foodcomp/Data/isoflav/isfl_tbl.pdf)>. Acesso em 10 mai. 2002.

UZZAN, M.; LABUZA, T. P. Critical issues in &RD of soy isoflavone-enriched foods and dietary supplements. *Journal of Food Science*, 69 (3): 77-86, 2004.

VYN, T.J.; XINGHUA, Y.; BRUUSELMA, T.W.; JACKSON, C.C. ; RAJCAN, I; BROUDER, S.M. Potassium fertilization effects on isoflavone concentrations in soybean (*Glycine max* (L.) Merr.). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*; 50 (12): 3501-3506, 2002.

WANG, G.; KUAN, S. S.; FRANCIS, O. J.; WARE, G. W. ; CARMAN, A. S. A simplified HPLC method for the determination of phytoestrogens in soybean and its processed products. *Journal of Agricultural Food Chemistry*, 38: 185-190, 1990.

WANG, H.; MURPHY, P. A. Isoflavone content in commercial soybean foods. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 1666-1673, 1994 a.

WANG, H.; MURPHY, P. A. Isoflavone Composition of American and Japanese soybeans in Iowa: effects of variety, crop year, and location. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 42: 1666-1673, 1994 b.

WANG, H.; MURPHY, P. A. Mass balance study of isoflavones during soybean processing. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44: 2377-2383, 1996.

WANG, C.; MA, Q.; PAGADALA, S.; SHERRAD, M. S. ; KRISHNAN, P. G. Changes of isoflavones during processing of soy protein isolates. *Journal of the American Oil Chemistry Society*, 75 (3): 337-341, 1998.



WATANABE, S.; YAMAGUCHI, M.; SOBUE, T.; TAKAHASHI, T.; MIURA, T.; ARAI, Y.; MAZUR, W.; WÄHÄLÄ, K.; ADLERCREUTZ, H. Pharmacokinetics of soybean isoflavones in plasma, urine and feces of men after ingestion of 60 g baked soybeans powder (kinako). *Journal of Nutrition*, 128: 1710-1715, 1998.

WOODS, M. N.; SENIE, R.; KRONENBERG, F. Effect of dietary soy bar on menopausal symptoms. Int: *The Abstracts of the 2<sup>nd</sup> International Symposium on the Role of Soy in preventing and Treating Chronicle Disease*. Brussels, Belgium, 15-18 Sept.; 1996. p.41.

WU, A. H.; ZIELGER, R.G.; NOMURA, A. M. Y.; WEST, D.W.; KOLONEL, L. N. ROSS, P. L. H.; HOOVER, R. N.; PIKE, M. C. Soy intake and risk of breast cancer in Asian and Asian Americans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68 (suplemento): 1437S-1143S, 1998.

WU, L. J.; ANDERSON, K. E. Sex and long-term soy diets affect the metabolism and excretion of soy isoflavones in humans. *American Journal of Clinical Nutrition*, 68 (suppl.): 1500S-15004S, 1999.

XU, X.; HARRIS, K.S.; WANG, H.; MURPHY, P. A. ; HENDRICH, S. Bioavailability of soybean isoflavones depends upon gut microflora women. *Journal of Nutrition*, 125: 2307-2315, 1995.

XU, X.; WANG, H. J.; MURPHY, P. A.; HENDRICH, S. Neither background diet nor type of soyfood affects short-term isoflavone bioavailability in women. *Journal of Nutrition*, 130: 798-801, 2000.

YAMAKOSHI, J.; PISKULA, M. K.; IZUMI, T.; TOBE, K.; SAITO, M.; KATAOKA, S.; OBATA, A.; KIKUCHI, M. Isoflavones aglycone-rich extract without soy protein attenuates atherosclerosis development in cholesterol-fed rabbits. *Journal of Nutrition*, 130: 1887-1893, 2000.

YAMORI, Y.; MORIGUCHI, E.H.; TERAMOTO, T.; MIURA, A.; FUKUI, Y.; HONDA, K.; FUKUI, M.; NARA, Y.; MORIGUCHI, Y. Soybean isoflavones reduce postmenopausal bone resorption in female japanese immigrants in Brazil: a ten-week study. *Journal of the American College of Nutrition*, 21 (6): 560-563, 2002.

ZANGELMI, A. C. B. ; TAGLIOLATTO, M. A.; DIAS, E. L. ; LANGE, D. A. *Produtos de soja, leite, farinha e outros*. Secretaria da Indústria, Comércio , Ciência e Tecnologia do Estado de São Paulo, 1982. p. 1-9, 80-96. (Série Tecnologia Agroindustrial, vol. 10).

ZHANG, Y.; WANG, G. J.; SONG, T. T.; MURPHY, P. A.; HENDRICH, S. Urinary disposition of the soybean isoflavones daidzein, genistein and glycitein among humans with moderate fecal isoflavone degradation activity. *Journal of Nutrition*, 129: 957-962, 1999.

ZHANG, Y. ; HENDRICH, S.; MURPHY, P. A. Glucuronides are the main isoflavone metabolites in women. *Journal of Nutrition*, 133: 399-4024, 2003.

ZUBIK, L.; MEYDANI, M. Bioavailability of soybean isoflavones from aglycone and glucoside form in American women. *American Journal of Clinical Nutrition*, 77 (6): 1459-1465, 2003.